

120-005
D2

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
15. Februar 2001 (15.02.2001)

PCT

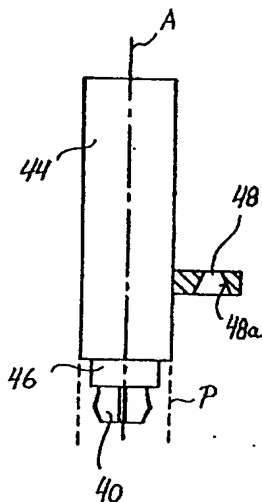
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/10554 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: **B01L** [DE/DE]; Prof.-Hermann-Klare-Strasse 6, D-07407 Rudolstadt (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP00/07711**
- (22) Internationales Anmeldedatum: 8. August 2000 (08.08.2000)
- (25) Einreichungssprache: **Deutsch**
- (26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**
- (30) Angaben zur Priorität:
199 37 607.7 9. August 1999 (09.08.1999) **DE**
100 17 802.2 10. April 2000 (10.04.2000) **DE**
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **BILATEC GESELLSCHAFT ZUR ENTWICKLUNG BIOTECHNOLOGISCHER SYSTEME MBH**
- (72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **BERGMANN, Clemens** [DE/DE]; Mühlenstrasse 53, D-07745 Jena (DE). **BIENHAUS, Gerhard** [DE/DE]; Karwendelstrasse 1, D-82407 Wielenbach (DE). **BERGER, Mario** [DE/DE]; Uhlandstrasse 6, D-07318 Bad Blankenburg (DE). **BÖTTGE, Jörg** [DE/DE]; Schwarzbürger Strasse 72, D-07407 Rudolstadt (DE).
- (74) Anwälte: **WEICKMANN, H.** usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): **AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,**

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: **LABORATORY ROBOT AND METHOD AND REAGENT KIT FOR ISOLATING NUCLEIC ACIDS**

(54) Bezeichnung: **LABOR-ROBOTER UND VERFAHREN UND REAGENZIENKIT ZUR ISOLIERUNG VON NUKLEIN-SÄUREN**



(57) Abstract: The invention relates to a laboratory robot comprising at least one robot arm which can be displaced within a predetermined working area and on which a gripping device (26) is arranged for grasping at least one functional unit that is to be moved by said robot arm. According to the invention, an orientating device (48) is additionally provided on the robot arm or on the gripping device (26). Said orientating device interacts with an opposed orientating device which is optionally provided on the functional unit in order to impart a predetermined fixed relative orientation to the functional unit and to the gripping device (26). The aim of the invention is to isolate nucleic acids out of a biological sample that comprises compartments containing nucleic acids, in particular, while using an inventive laboratory robot. To this end, negatively charged particles consisting of a polymer material and of a reagent, which is comprised of a mixture of a charged or neutral detergent and of an aliphatic alcohol, or which is comprised

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

of an aqueous solution of at least one chaotropic salt and, optionally, of an aliphatic alcohol, are added to the sample. In addition, the particles are separated out from the salient solution in an appropriate manner, and the nucleic acids bound to the particles are optionally washed and detached from the same using an elution buffer, or the nucleic acids bound to the particles are directly used for subsequent methods, such as polymerase chain reactions (PCR).

(57) **Zusammenfassung:** Bei einem Labor-Roboter mit wenigstens einem in einem vorbestimmten Arbeitsbereich bewegbaren Roboterarm, an welchem eine Greifvorrichtung (26) zum Ergreifen mindestens einer durch den Roboterarm zu bewegenden Funktionseinheit angeordnet ist, ist erfindungsgemäss an dem Roboterarm bzw. der Greifvorrichtung (26) ferner eine Orientiervorrichtung (48) vorgesehen, welche mit einer an der Funktionseinheit gewünschtenfalls vorgesehenen Gegenorientiervorrichtung zusammenwirkt, um der Funktionseinheit und der Greifvorrichtung (26) eine vorbestimmte feste Relativorientierung zu verleihen. Zur Isolierung von Nukleinsäuren aus einer biologische, nukleinsäurehaltige Kompartimente enthaltenden Probe, insbesondere unter Verwendung eines erfindungsgemässen Labor-Roboters, versetzt man die Probe mit negativ geladenen Partikeln aus einem Polymermaterial und einem Reagenz, bestehend aus einem Gemisch eines geladenen oder ungeladenen Detergens und einem aliphatischen Alkohol, oder bestehend aus einer wässrigen Lösung mindestens eines chaotropen Salzes und gegebenenfalls einem aliphatischen Alkohol, trennt die Partikel in geeigneter Weise von der überstehenden Lösung ab, wäscht ggf. und löst die an die Partikel gebundenen Nukleinsäuren mittels eines Elutionspuffers von den Partikeln, oder verwendet die an die Partikel gebundenen Nukleinsäuren direkt für weitere Verfahren, wie z.B. PCR.

- 1 -

**Labor-Roboter und Verfahren und Reagenzienkit zur Isolierung
von Nukleinsäuren
Beschreibung**

5

10

15

Die Erfindung betrifft einen Labor-Roboter mit wenigstens einem in einem vorbestimmten Arbeitsbereich bewegbaren Roboterarm, an welchem eine Greifvorrichtung zum Ergreifen mindestens einer durch den Roboterarm zu bewegendenden Funktionseinheit angeordnet ist. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren aus einer biologische, nukleinsäurehaltige Kompartimente enthaltenden Probe sowie ein Verfahren zur Amplifikation oder/und Bestimmung von Nukleinsäuren mittels PCR, und schließlich einen Reagenzienkit für die Isolierung von Nukleinsäuren aus einer biologische, nukleinsäurehaltige Kompartimente enthaltenden Probe.

20

25

30

Bei der in US-PS 4,683 195 beschriebenen Polymerasekettenreaktion (PCR) handelt es sich um ein einfaches Verfahren zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren. Durch diese Vervielfältigung ist der Nachweis winzigster Mengen an Nukleinsäuren möglich geworden. Das Verfahren hat eine Nachweisempfindlichkeit, die bisher in der wissenschaftlichen Analytik beispiellos ist: Wo früher ein Nachweis erst ab ca. 10^6 Molekülen möglich war, können jetzt schon etwa 10 bis 100 Moleküle nachgewiesen werden. Eine aktuelle und spektakuläre Anwendung dieser Nachweisempfindlichkeit ist z.B. die Identifizierung von Tätern bei der Verbrechensaufklärung. Die PCR-Technologie ist ein zentraler Bestandteil der in der Öffentlichkeit diskutierten Erstellung einer "Gen-Kartei". Auch für den Nachweis von gentechnisch-veränderten Lebensmitteln oder die Untersuchung von Blutkonserven auf Viren wie HIV oder HCV ist die PCR unerlässlich.

In kürzester Zeit hat sich die PCR-Technologie im wissenschaftlichen Alltag etabliert und stellt damit einen Wachstumsmarkt dar. Voraussetzung für das

- 2 -

PCR-Verfahren ist eine sogenannte "Probenvorbereitung", welche die Nukleinsäuren aus den verschiedensten Materialien wie Speichel, Blut, Liquor; Organismen wie z.B. Bakterien, Hefen, Pilzen aber auch Pflanzenmaterial, Fleisch und weiteren nukleinsäureenthaltenden Proben freisetzt und so vorbereitet, dass das PCR-Verfahren ohne Störungen durchgeführt werden kann. Diese Probenvorbereitung ist derzeit das Nadelöhr für die breite Anwendung, weil vor allem automatisierbare Verfahren fehlen.

Für die Automatisierung sind Partikel als Festphase von großer Bedeutung, die entweder verbunden mit Filtration oder Zentrifugation in der Probenvorbereitung eingesetzt werden, oder aber in Form von sogenannten Magnetpartikeln mit Hilfe von magnetischen Feldern abgetrennt werden können. Als zusammenfassende Literaturstelle wird US 4,554,088 genannt.

In der Literatur sind verschiedene Verfahren für die Probenvorbereitung zur PCR beschrieben, so z.B. unter Verwendung von anorganischen Silikaoberflächen als Adsorber für Nukleinsäuren, die in Gegenwart von chaotropen Salzen nach EP 0 389 063 an das Silika binden und mit diesem Prinzip isoliert werden können.

Die US-PS 5,705,628 beschreibt als Adsorber für Nukleinsäuren Magnetpartikel, die Carboxylgruppen an der Oberfläche tragen. Die Verwendung solcher Partikel ist in einem Mehrschrittprozeß beschrieben, bei dem zunächst in einer zeitlich gestaffelten Abfolge zu einer Probe ein Lysepuffer zum Aufschluß der Probe, anschließend die Magnetpartikelsuspension und danach ein spezieller Puffer, der die Polarität und Hydrophobizität der resultierenden Lösung so einstellt, daß Nukleinsäuren an die Magnetpartikel reversibel binden, zugegeben wird. Es handelt sich dabei um einen hochviskosen Puffer, der Polyethylenglykol (20 %) zusammen mit 2,5 M Kochsalz enthält (im Folgenden PEG-Puffer genannt).

- 3 -

Nach ein- oder mehrmaligem Waschen der Magnetpartikel und Resuspension der Magnetpartikel in einem Elutionspuffer wird die Nukleinsäure desorbiert und kann nach Abtrennen der Magnetpartikel entnommen werden. Für eine Automatisierung ergeben sich aber aus diesem Prozeß drei Probleme:

- 5 a) Die in einer zeitlich gestaffelten Abfolge notwendigen Pipettierschritte sind für eine Automatisierung, z.B. mit einem Pipettierroboter, äußerst zeitaufwendig, so daß dieses Verfahren nicht für einen höheren Probendurchsatz geeignet ist.
 - 10 b) Der Einsatz eines hochviskosen Puffers erfordert bei der Automatisierung einen erheblichen Aufwand, eine entsprechend notwendige Durchmischung zu erreichen. Da vor allem bei Automatisierungen 96-Well-Mikrotiterplatten als Reaktionsgefäße eingesetzt werden, muß durch eine entsprechende Schüttel- oder Rüttel-Apparatur oder andere mechanische Durchmischung dafür gesorgt werden, daß in allen Gefäßen eine
15 gleichmäßige Mischung erfolgt.
 - c) Eine weitere Problematik ergibt sich aus der Tatsache, daß die Proben vielfältiger Natur sind. Die bekannten Methoden der Probenvorbereitung ließen für viele Proben im Hinblick auf ihre Effektivität zu wünschen übrig.
- 20 Bei der Automatisierung von Abläufen im Labor, beispielsweise im Bereich der medizinischen Technik bzw. der Analytik oder im Bereich der Molekularbiologie und Humandiagnostik, insbesondere bei der Nukleinsäureanalytik, sind seit einigen Jahren verschiedene Arten von Labor-Robotern in Gebrauch. Es handelt sich dabei vorwiegend um Systeme, bei denen ein
25 Betätigungsende des Roboterarms längs dreier zueinander im Wesentlichen orthogonal verlaufender Raumachsen linear verschiebbar angeordnet ist (kartesische XYZ-Systeme). Solche Systeme werden beispielsweise von der Firma Tecan, Firma Beckmann, von Firma Canberra Packard sowie von Firma Rosys in verschiedenen Ausführungen mit unterschiedlicher Anzahl
30 von Roboterarmen angeboten. Daneben sind jedoch auch Systeme im Verkauf, bei denen eine Roboterarm-Halterung längs einer Schiene linear verschiebbar, ein Oberarmteil des Roboterarms an dieser Roboterarm-

- 4 -

Halterung verschwenkbar und ein Unterarmteil des Roboterarms an dem Oberarmteil verschwenkbar angeordnet ist. Solche Systeme werden beispielsweise von Firma CRS in Kanada sowie von Firma Zymark in den U.S.A. angeboten und sind im Laborbereich etabliert.

5

Bei allen diesen Systemen muss der Roboterarm mit einer ganzen Reihe verschiedener Funktionseinheiten gekoppelt werden können, um die Proben in der gewünschten Weise behandeln zu können. Beispielsweise kann es erforderlich sein, ein eine Mehrzahl von Proben aufnehmendes mikrotitrationsplatten-artiges Verbundgefäß (vgl. US-A-4,154,795) aus einem Aufbewahrungsbereich zu einer Behandlungsposition zu transportieren, dann von wenigstens einem der Behältnisse des Verbundgefäßes den Deckel abzunehmen, ferner der in dem Behältnis enthaltenen Probe durch Pipettieren Reagenzien hinzuzufügen und anschließend nach erneutem Aufsetzen des Deckels das Verbundgefäß wieder in dem Aufbewahrungsbereich abzustellen. Um die Funktionseinheiten und gegebenenfalls auch die Mikrotitrationsplatten Weise tragen zu können, sind die vorstehend beschriebenen Labor-Roboter derart ausgebildet, dass sie in vertikaler Richtung (Z-Richtung) Kräfte von 15 N bis 40 N, bevorzugt 20 N bis 30 N, ausüben können.

20

Hierzu ist aus der EP-A-O 557 828 bzw. der parallelen US-A-5,472,669 ein Labor-Roboter bekannt, in dessen Arbeitsbereich eine Mehrzahl von Funktionseinheiten an vorbestimmten Parkposition bereitgehalten ist. An dem Roboterarm dieses Labor-Roboters ist eine Greifvorrichtung angebracht, mit deren Hilfe die Funktionseinheiten nach Bedarf aus ihren Parkpositionen geholt und nach Erledigung des mit ihnen auszuführenden Funktionsschritts wieder an der Parkposition abgestellt werden können. Beim Einsatz der aus diesen Druckschriften bekannten Greifervorrichtung kann es jedoch geschehen, dass sich beim Aufnehmen der Funktionseinheit von der Parkposition, während der Durchführung des Funktionsschritts oder beim Wiederabstellen der Funktionseinheit an der Parkposition deren Orientierung relativ zum

30

- 5 -

Roboterarm ändert. Dies kann zu Betriebsstörungen bis hin zur vollständigen Betriebsunfähigkeit des Labor-Roboters führen.

5 Aus der EP-A-0 734 768 bzw. der DE-U-295 05 652, der DE-U-295 05 707 und der DE-U-295 15 990, aus der EP-A-0 676 643 bzw. der DE-A-44 12 286 und aus der DE-A-198 01 178 sind Greifvorrichtungen zum Abnehmen bzw. Aufsetzen von Deckeln von bzw. auf die Proben enthaltende Gefäße bekannt. Da die verwendeten Deckel als rotations-

10 vorrichtungen das vorstehend diskutierte Orientierungsproblem nicht.

Zum weiteren Stand der Technik sei ergänzend noch auf die DE-U-297 20 432 verwiesen.

15 Demgegenüber ist es Aufgabe der Erfindung, einen Labor-Roboter der gattungsgemäßen Art bereitzustellen, bei welchem die Gefahr einer unbeabsichtigten Störung der gewünschten Relativorientierung von Funktionseinheit und Greifvorrichtung zumindest verringert, wenn nicht gar vollständig beseitigt ist.

20 Eine weitere Aufgabe ist es, eine Möglichkeit bereitzustellen, die Probenvorbereitung effektiver zu gestalten und dabei die Nachteile des Standes der Technik zu vermeiden. Insbesondere ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Möglichkeiten bereitzustellen, die

25 Probenvorbereitung und gegebenenfalls auch die spätere PCR-Reaktion mit Hilfe des Einsatzes von Pipettierrobotern durchzuführen und hierfür eine Vereinfachung und Automatisierung der bisherigen Verfahren zu ermöglichen.

30 Diese Aufgaben werden erfindungsgemäß durch einen Labor-Roboter der eingangs genannten Art gelöst, bei welchem an dem Roboterarm ferner eine Orientiervorrichtung vorgesehen ist, welche mit einer an der Funktions-

- 6 -

einheit gewünschtenfalls vorgesehenen Gegenorientiervorrichtung zusammenwirkt, um der Funktionseinheit und dem Roboterarm eine vorbestimmte feste Relativorientierung zu verleihen, oder/und bei welchem wenigstens zwei Funktionseinheiten vorgesehen sind, wobei wenigstens eine der Funktionseinheiten eine derartige, mit der Orientiervorrichtung des Roboterarms zusammenwirkende Gegenorientiervorrichtung aufweist. Besteht bei dem bekannten Labor-Roboter nach dem Ergreifen der Funktionseinheit durch die Greifvorrichtung des Roboterarms noch die Möglichkeit einer Rotation der Funktionseinheit, so wird eine derartige Rotation bei dem erfindungsgemäßen Labor-Roboter durch das Zusammenwirken von Orientier- und Gegenorientiervorrichtung unterbunden.

Grundsätzlich ist es zwar möglich, die Orientiervorrichtung und die Gegenorientiervorrichtung durch ein- bzw. ausschaltbare Kräfte miteinander zusammenwirken zu lassen. Beispielsweise könnten die Greifvorrichtung bzw. der Roboterarm und die Funktionseinheit nach Ergreifen der Funktionseinheit elektromagnetisch miteinander gekoppelt werden. Das gewünschte Zusammenwirken von Orientier- und Gegenorientiervorrichtung kann jedoch in konstruktiv und steuerungstechnisch einfacher Weise durch einfachen mechanischen Eingriff von Orientier- und Gegenorientiervorrichtung bewerkstelligt werden.

Hierzu kann eine der Vorrichtungen, nämlich die Orientiervorrichtung oder die Gegenorientiervorrichtung, einen Orientierungsdorn umfassen, während die jeweils andere Vorrichtung, nämlich die Gegenorientiervorrichtung oder die Orientiervorrichtung, eine Aufnahme für den Orientierungsdorn umfaßt. Soll die Greifvorrichtung auch zum Verdeckeln von die Proben enthaltenden Gefäßen eingesetzt werden, so ist es vorteilhaft, wenn der Orientierdorn an der Funktionseinheit und die Aufnahme am Roboterarm bzw. der Greifvorrichtung angeordnet ist. In diesem Fall übersteigt der von der Greifvorrichtung und der Orientiervorrichtung gemeinsam eingenommene Bauraum den von der Greifvorrichtung alleine eingenommenen Bauraum nur

- 7 -

geringfügig, so dass die Bewegungsmöglichkeiten des Roboterarms, der vorzugsweise in einem vorbestimmten Arbeitsbereich des Labor-Roboters im Wesentlichen frei im Raum bewegbar ist, durch die Orientiervorrichtung praktisch nicht eingeschränkt werden.

5

Der Eingriff von Orientierdorn und Aufnahme kann bei der Annäherung der Greifvorrichtung an die Funktionseinheit hergestellt werden, wobei zur Erleichterung des In-Eingriff-Bringens vorgesehen sein kann, dass an dem Orientierdorn oder/und der Aufnahme wenigstens eine Einweisungsschräge
10 vorgesehen ist.

10

15

20

25

Wie bereits erwähnt kann die Greifvorrichtung nach Art einer Verdeckelungs-Greifvorrichtung ausgebildet sein. Beispielsweise kann die Greifvorrichtung länglich und gewünschtenfalls im Wesentlichen zylindersymmetrisch ausgebildet sein und wenigstens ein Greifwerkzeug sowie eine Betätigungsvorrichtung zur Betätigung des Greifwerkzeugs umfassen, wobei das Greifwerkzeug im Wesentlichen innerhalb einer Projektion der Betätigungsvorrichtung in Richtung der Längsachse der Greifervorrichtung angeordnet ist. Derartige Verdeckelungs-Greifvorrichtungen sind beispielsweise aus den vorstehend bereits angesprochenen Druckschriften EP-A-0 734 768 (bzw. DE-U-295 05 652, DE-U-295 05 707 und DE-U-295 15 990), EP-A-0 676 643 (bzw. DE-A-44 12 286) und DE-A-198 01 178 bekannt. Um mit diesen Greifvorrichtungen zusammenwirken zu können, kann an der Funktionseinheit eine in Abhängigkeit des jeweiligen Typs von Greifvorrichtung ausgebildete Angriffsstelle für die Greifvorrichtung vorgesehen sein, beispielsweise ein Angriffszapfen oder eine Angriffsvertiefung.

30

Grundsätzlich kann die Betätigung der Greifvorrichtung elektrisch, beispielsweise elektromagnetisch, oder/und hydraulisch oder/und pneumatisch erfolgen. Alternativ ist es jedoch auch möglich, die Betätigung der Greifvorrichtung von einer Bewegung des Roboterarms abzuleiten. Beispielsweise kann die Betätigungsvorrichtung nach Art eines Kugelschreibers bzw.

- 8 -

eines Druckbleistifts ausgebildet sein, d.h. durch ein erstes Anfahren gegen einen Widerstand kann die Greifvorrichtung aus einem Freigabezustand in einen Greifzustand und durch ein nochmaliges Anfahren gegen einen Widerstand wieder in den Freigabezustand übergeführt werden. Bevorzugt wird
5 der zum "Umschalten" der Greifvorrichtung benötigte Widerstand von der auf einer Grundplatte des Arbeitsbereichs des Labor-Roboters in einer Parkposition abgestellten Funktionseinheit selbst der Bewegung des Roboterarms bzw. der Greifvorrichtung entgegengesetzt, wenn dieser bzw. diese beim Aufnehmen der Funktionseinheit in einer einfachen Abwärts-
10 bewegung auf die Funktionseinheit trifft oder die Funktionseinheit beim Abstellen in der ihr zugeordneten Parkposition auf der Grundplatte auftrifft.

Der erfindungsgemäße Labor-Roboter kann eine ganze Reihe verschiedene Funktionseinheiten umfassen.

15 Wenigstens eine dieser Funktionseinheiten kann beispielsweise einen Gabelrahmen zum Transport von die Proben beinhaltenden Gefäßen umfassen, bevorzugt also einen Gabelrahmen zum Transport wenigstens einer Mikrotitrationsplatte bzw. eines mikrotitrationsplatten-artigen Verbundgefäßes
20 oder Gefäßverbundes. Mit diesem Gabelrahmen, der im kleinen Maßstab letztendlich wie eine Art Gabelstapler funktioniert, kann die Mikrotitrationsplatte von einer ersten Position des Arbeitsbereichs aufgenommen werden und zu einer beliebigen zweiten Position, beispielsweise einer Behandlungsposition, transportiert und dort abgelegt werden. Nachdem
25 diese Funktion ausgeführt worden ist, kann der Gabelrahmen wieder an der ihm zugeordneten Parkposition abgelegt werden. Zur Erleichterung des Aufnehmens und Absetzens der Mikrotitrationsplatte mittels des Gabelrahmens wird vorgeschlagen, wenigstens eine Lagervorrichtung vorzusehen, mittels derer die Mikrotitrationsplatte in einem vorbestimmten Abstand über
30 der Grundplatte des Arbeitsbereichs des Labor-Roboters gehalten werden kann.

- 9 -

Anschließend kann die Greifvorrichtung zum Entdecken wenigstens eines vorbestimmten Behältnisses der Mikrotitrationsplatte genutzt werden, bevor der Roboterarm zu einer anderen Parkposition bewegt wird und von dort eine weitere Funktionseinheit holt.

Die weitere Funktionseinheit kann beispielsweise zumindest den Pipettenspitzen-Aufnahmeteil einer Pipettiervorrichtung umfassen. Mit Hilfe der Pipettiervorrichtung können in das Probenbehältnis verschiedene Medien, beispielsweise Nährlösungen oder flüssige oder auf der Oberfläche von Partikeln, etwa Magnetpartikeln, gebundene Reagenzien eingebracht werden.

Im Falle der Einbringung von Magnetpartikeln können diese mit den an ihnen anhaftenden Reaktionsprodukten mittels einer Magnetvorrichtung von der restlichen Probe getrennt werden. Die Magnetvorrichtung kann hierzu vorzugsweise als erfindungsgemäß von dem Roboterarm bzw. dessen Greifvorrichtung aufnehmbare Funktionseinheit ausgebildet sein und wenigstens einen Permanentmagneten umfassen. Führt man mit dieser Magnetvorrichtung an dem Reaktionsgefäß entlang, so schlagen sich die Magnetpartikel in unmittelbarer Nähe der Magnetvorrichtung an der Wandung des Reaktionsgefäßes nieder und folgen deren Bewegung. Somit ist es möglich, sie in einem konisch zulaufenden unteren Ende des Reaktionsgefäßes zu sammeln. Hierdurch kann insbesondere für Gefäße mit einem Volumen von zwischen etwa 20 ml und etwa 200 ml, vorzugsweise zwischen etwa 20 ml und etwa 70 ml, ein praktikables, einfaches und vollautomatisches Werkzeug zur Durchführung einer Magnetseparation bereitgestellt werden.

Als weitere Funktionseinheit kann ein Barcode-Leser an den Roboterarm angekoppelt werden. Ein solcher Barcode-Leser kann verschiedenste Aufgaben übernehmen, beispielsweise die Erkennung von mittels Barcodes gekennzeichneten Probenröhrchen, Modulen oder Racksystemen, die sich im Arbeitsbereich des Labor-Roboters befinden. Die von dem Barcode-Leser

- 10 -

erfassten Daten können einer Steuereinheit zugeführt werden, welche diese bei der Steuerung/Regelung der Bewegung des Roboterarms oder/und der Betätigung der Greifvorrichtung oder/und des Betriebs der Magnetvorrichtung oder/und des Betriebs der Pipettiereinheit berücksichtigt.

5

Festzuhalten ist, dass die vorstehend diskutierten Funktionseinheiten als nicht abschließende Aufzählung der in Verbindung mit dem erfindungsgemäßen Labor-Roboter einsetzbaren Funktionseinheiten zu verstehen sind. Neben diesen gibt es noch weitere, dem Fachmann bekannte Funktionseinheiten, die bei der Automatisierung von Abläufen in Laboren chemischer oder molekularbiologischer Art genutzt werden und die durch Vorsehen einer Angriffsstelle für die Greifvorrichtung sowie durch Vorsehen einer Gegenorientierungsvorrichtung, beispielsweise eines Orientierdorns, zu einer Funktionseinheit im erfindungsgemäßen Sinne gemacht werden können. Als

10

15

Die erfindungsgemäßen Aufgaben wurden weiterhin gelöst durch einen Reagenzienkit für die Isolierung von Nukleinsäuren aus einer biologische, nukleinsäurehaltige Kompartimente enthaltenden Probe, welcher dadurch gekennzeichnet ist, daß er

20

- a) negativ geladene Partikel aus einem Polymermaterial,
- b) ein Reagenz I bestehend aus einem Gemisch eines geladenen oder ungeladenen Detergens und einem aliphatischen Alkohol, oder/und ein Reagenz II, bestehend aus einer wässrigen Lösung mindestens eines chaotropen Salzes und gegebenenfalls einem aliphatischen Alkohol, und
- c) eine Proteinase-Lösung enthält.

25

30

Der Begriff "biologische, nukleinsäurehaltige Kompartimente" bezeichnet im Rahmen der vorliegenden Erfindung alle Strukturen in zu untersuchenden Proben, aus denen Nukleinsäuren durch Lyse freigesetzt werden müssen.

- 11 -

Insbesondere sind Zellen, einschließlich bakterieller oder Hefe-Zellen, sowie Viren von dieser Definition umfasst.

Der erfindungsgemäße Reagenzienkit beinhaltet als Reagenzien I oder/und
5 II Zusammensetzungen mit überraschend einfachen Rezepturen, die für eine effektive Lyse der Proben, d.h. der biologischen, nukleinsäurehaltigen Kompartimente, eingesetzt werden können. Des weiteren ermöglichen die im erfindungsgemäßen Reagenzienkit enthaltenen Reagenzien I und II eine
10 sofort nach der Lyse stattfindende Bindung der freigesetzten Nukleinsäuren an die Polymerpartikel, ohne daß der Puffer gewechselt bzw. Zugabe anderer Substanzen nötig ist. Durch Einsatz von neutralen kationischen oder anionischen Detergenzien in hohen Konzentrationen zusammen mit aliphatischen Alkoholen kann eine besonders effiziente und vollständige Lyse erreicht werden, was insbesondere auf Proben zutrifft, welche
15 Hefezellen enthalten. Bei Verwendung des Reagenz II enthaltend eine wäßrige Lösung mindestens eines chaotropen Salzes kann eine besonders effektive Lyse von Proben enthaltend Vollblut bewirkt werden. Für alle anderen Anwendungsfälle sind die Reagenzien I und II ebenfalls geeignet, wobei für den jeweiligen Anwendungsfall die bessere Eignung des einen
20 oder anderen Reagenz vom Fachmann vorab leicht bestimmt werden kann.

Der erfindungsgemäße Reagenzienkit ermöglicht die Durchführung der Lyse von Zellen oder Viren und Bindung der Nukleinsäuren an Partikel sowie die Abtrennung der Partikel von der Probenlösung in einem quasi
25 Einschrittverfahren, in dem zu einer Mischung aus Partikeln, Reagenz I oder II und Proteinase-Lösung die Probensubstanz zugegeben wird, und nach entsprechender Inkubation die Probenlösung wieder abgetrennt werden kann unter Zurücklassung der aus den Zellen abgetrennten Nukleinsäuren in an die Polymerpartikel gebundener Form.

- 12 -

In bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung enthält der Reagenzienkit zusätzlich noch Waschpuffer oder/und Elutionspuffer zur Abtrennung der Nukleinsäuren von den Polymerpartikeln.

5 Der erfindungsgemäße Reagenziensatz beinhaltet damit in besonders bevorzugter Ausführungsform alle Reagenzien zur Durchführung einer Nukleinsäureisolierung aus Proben. Dabei besteht die Möglichkeit, die Reagenzien zunächst einzeln, also jeweils in separaten Flaschen, im Reagenziensatz vorzuhalten und erst unmittelbar vor der Anwendung eine
10 stabile Arbeitslösung herzustellen. Dies hat den Vorteil, daß je nach Probe sehr unterschiedliche Lyseprinzipien angewandt werden können. So wurde überraschenderweise festgestellt, daß ein Puffer mit Natriumdodecylsulfat zusammen mit Ethanol für die Isolierung von Nukleinsäure aus Hefe besonders vorteilhaft ist, während ein Puffer mit Guanidiniumthiocyanat und
15 gegebenenfalls Ethanol für den Aufschluß und die Isolierung von Nukleinsäuren aus Vollblut besser geeignet ist.

Der erfindungsgemäße Reagenzienkit enthält daher in einer bevorzugten Ausführung in separaten Flaschen die Reagenzien A) Partikel, B) Reagenz
20 I mit Detergenz/Alkohol-Gemisch, C) Reagenz II mit hochmolaren Salzen von chaotropen Verbindungen und gegebenenfalls vorzugsweise einem aliphatischen Alkohohl sowie D) eine ProteinaseLösung.

Darüber hinaus kann der erfindungsgemäße Reagenzienkit auch eine oder
25 mehrere Arbeitslösungen, enthaltend Mischungen aus A, B und D sowie aus A, C und D gebrauchsfertig vorhalten.

Ein erfindungsgemäßer Reagenzienkit, der sowohl Reagenz I als auch Reagenz II beinhaltet, ist geeignet für die Isolierung von Nukleinsäuren aus
30 einer großen Vielzahl von Proben, wobei jeweils bezogen auf die Anwendung die letztendliche Herstellung der Arbeitslösung durch den Anwender erfolgt. Selbstverständlich ist auch ein Reagenzienkit im Rahmen

- 13 -

der vorliegenden Erfindung umfaßt, welcher nur eines der beiden Reagenzien beinhaltet und daher besonders geeignet ist für z.B. die Isolierung von Nukleinsäuren aus Hefe-enthaltenden Proben bzw. Vollblut. Die Anwendung eines der Reagenzien bei anderen Proben soll durch diese bevorzugten Anwendungen nicht eingeschränkt sein.

Wie bereits erwähnt, können weitere Komponenten des erfindungsgemäßen Reagenzienkits Waschlösungen für die Partikel sein, die in einer separaten Flasche abgefüllt sind. Zur Elution der Nukleinsäure von den Partikeln wird ein Elutionspuffer benötigt, der sich insbesondere durch niedrige Ionenstärke auszeichnen sollte. Diese Komponente kann ebenfalls ein Teil des erfindungsgemäßen Reagenziensatzes sein. Sowohl geeignete Waschlösungen als auch Elutionspuffer sind im Prinzip dem Fachmann bekannt.

Die Funktionsweise der einzelnen Bestandteile des erfindungsgemäßen Reagenzienkits wird im Folgenden geschildert:

Eine Probe wird mit einer Arbeitslösung enthaltend die Bestandteile A, B, D oder A, C, D versetzt und inkubiert. Im Einzelfall kann die Inkubation bei höherer Temperatur stattfinden. Die Arbeitslösung bewirkt gleichzeitig den Aufschluß der Probe, die Freisetzung der Nukleinsäuren sowie die Bindung an die Partikel, die Bestandteil der Arbeitslösung sind. Die Partikel werden abgetrennt, der klare Überstand abgesaugt und verworfen. Die Partikel werden danach in einer geeigneten Waschlösung gewaschen, wobei sich alkoholische Lösungen wiederum aus Gründen der einfachen Mischbarkeit als besonders vorteilhaft erwiesen. Insbesondere Wasser/Ethanol- oder allgemein Wasser/aliphatischer Alkohol-Gemische im Verhältnis 70 bis 30 Teile Wasser mit 30 bis 70 Teilen Alkohol ergeben im Rahmen der Erfindung befriedigende Ergebnisse. Der Waschprozeß wird je nach Probe ein- oder mehrmals wiederholt und die gewaschenen und abgeschiedenen Partikel mit einem Puffer niedriger Ionenstärke aufgenommen, so daß die Nukleinsäuren

- 14 -

desorbieren und in Lösung gehen. Danach kann eine Weiterverarbeitung z.B. für eine PCR-Amplifikation erfolgen.

In einer bevorzugte Ausführungsform der Erfindung enthält der Reagenzienkit als negativ geladene Partikel solche aus Polystyrol oder Polyvinylalkohol, wobei die Partikel aus Polyvinylalkohol eine besonders bevorzugte Ausführungsform darstellen.

Obwohl es prinzipiell natürlich möglich ist, nicht magnetisch beeinflussbare Partikel zu verwenden, ist es bevorzugt, magnetisch beeinflussbare Partikel vorzusehen, welche bei der Isolierung der Nukleinsäuren besonders leicht über einen Magneten an einer Stelle im Reaktionsgefäß konzentriert werden können und von denen die verbleibende Probenlösung besonders einfach abgetrennt werden kann.

Bevorzugt weisen die Partikel im Reagenzienkit einen durchschnittlichen Durchmesser von 0,1 bis 100 μm und insbesondere von 1 bis 10 μm auf. Partikel dieser Durchmesser erlauben eine gute und effektive Bindung von Nukleinsäuren.

Die negative Ladung der Partikel beruht in einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung auf der Anwesenheit von Carboxylgruppen auf der Oberfläche der Partikel. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung besonders bevorzugt einzusetzende Partikel sind z.B. in der EP 0 843 591 beschrieben.

Bevorzugt enthält das Reagenz I des erfindungsgemäßen Reagenzienkits als Detergens Natriumdodecylsulfat oder Cetylammoniumbromid (CTAB), vorzugsweise jeweils in einer Menge von 1 bis 10% bezogen auf das Reagenzvolumen.

- 15 -

Als aliphatischer Alkohol ist in Reagenz I vorzugsweise Ethanol enthalten, wobei eine Konzentration von mindestens 40 Vol. % zu guten Ergebnissen führt und daher bevorzugt ist.

5 Reagenz II enthält bevorzugt wässrige Lösungen von Guanidiniumhydrochlorid oder -thiocyanat, wobei wiederum Konzentrationen dieser Salze von 2 bis 8 M bevorzugt sind.

10 Auch Reagenz II kann einen aliphatischen Alkohol wie für Reagenz I beschrieben enthalten, was vorteilhaft sein kann durch Herabsetzen der Viskosität der Probe.

15 Die Reagenzien I und II enthalten ggf. weitere übliche und geeignete Puffer- und/oder Hilfssubstanzen. Beispielhaft für Puffersubstanzen sei TRIS/HCl genannt, Hilfssubstanzen können z.B. Komplexbildner wie EDTA sein. Der pH-Wert der Reagenzien wird vorzugsweise auf ungefähr den physiologischen pH eingestellt.

20 Die im erfindungsgemäßen Reagenzienkit enthaltene Proteinase dient zur Vermeidung von Störungen aufgrund der Anwesenheit von Proteinen nach Aufschluss der biologischen, nukleinsäurehaltigen Kompartimente. Bevorzugt wird hierzu im erfindungsgemäßen Reagenzienkit Proteinase K eingesetzt, wobei die Menge an eingesetzter Proteinase bei der Nukleinsäure-Isolierung von der Menge der vorhandenen Zellen und damit
25 von der Menge der Proteine abhängig ist. Geeignete Konzentrationen von Proteinase kann der Fachmann leicht ermitteln.

30 Der erfindungsgemäße Reagenzienkit ermöglicht eine leichte und schnelle Isolierung von Nukleinsäuren aus Proben, insbesondere für die anschließende Durchführung einer PCR-Reaktion und ist insbesondere zur Anwendung mit einem erfindungsgemäßen Laborroboter vorgesehen und geeignet. Da lediglich Probe zu z.B. einer vorbereiteten Arbeitslösung

- 16 -

enthaltend alle anderen notwendigen Komponenten zugegeben werden muß, nach Separierung der Partikel über einen z.B. einen Magneten leicht die verbleibende Probenlösung entfernt werden kann und nach ggf. nötigem Waschen eluiert werden kann unter Gewinnung der Nukleinsäuren, kann ein
5 entsprechendes Verfahren nämlich leicht automatisiert werden. Lediglich ca. 4 Pipettierschritte sind nötig bis zur letztendlichen Probengewinnung.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren aus einer biologische, nukleinsäurehaltige
10 Kompartimente enthaltenden Probe, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man die Probe gleichzeitig mit negativ geladenen Partikeln aus einem Polymermaterial und einem Reagenz, bestehend aus einem Gemisch eines geladenen oder ungeladenen Detergens und einem aliphatischen Alkohol, oder bestehend aus einer wässrigen Lösung mindestens eines chaotropen
15 Salzes und gegebenenfalls ebenfalls einem aliphatischen Alkohol versetzt, die Partikel in geeigneter Weise von der überstehenden Lösung abtrennt, ggf. wäscht und entweder die an die Partikel gebundenen Nukleinsäuren direkt für weitere Verfahren, z.B. PCR, verwendet, oder die an die Partikel gebundenen Nukleinsäuren mittels eines Elutionspuffers von den Partikeln
20 löst.

Dieses Verfahren ist insbesondere geeignet und vorteilhaft zur Durchführung mit dem erfindungsgemäßen Laborroboter.

25 Das erfindungsgemäße Verfahren wird im Prinzip unter Verwendung der oben bereits für den erfindungsgemäßen Reagenzienkit beschriebenen Komponenten durchgeführt, weshalb für eine nähere Beschreibung der Komponenten auf die obigen Ausführungen verwiesen wird. Es ist dabei bevorzugt, eine Proteinase, vorzugsweise Proteinase K zur Vermeidung von
30 Störungen durch Proteine zuzusetzen. Die verwendeten Partikel und Reagenzien entsprechen den oben beschriebenen, ebenso wie geeignete Wasch- und Elutionspuffer, die ebenfalls im erfindungsgemäßen Verfahren

- 17 -

eingesetzt werden. Besonders bevorzugt wird zum Waschen mindestens 60 %iges Ethanol eingesetzt. Es ist außerdem bevorzugt, zur Isolierung von Nukleinsäuren aus Proben enthaltend Hefen, ein Reagenz enthaltend Detergens und Alkohol entsprechend Reagenz I zu verwenden, wogegen zur Isolierung von Nukleinsäuren aus Vollblut insbesondere ein Reagenz enthaltend chaotrope Salze entsprechend Reagenz II eingesetzt wird.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann prinzipiell zur Isolierung von DNA oder RNA angewandt werden, wobei allerdings die Isolierung von DNA bevorzugt ist.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Amplifikation oder/und Bestimmung von Nukleinsäuren mittels einer Polymerase-Ketten-Reaktion, bei dem die zu amplifizierende Nukleinsäure aus einer biologische, nukleinsäurehaltige Kompartimente enthaltenden Probe mit Hilfe des oben beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahrens bzw. mit Hilfe des oben beschriebenen erfindungsgemäßen Reagenzienkits isoliert wird. Ein besonderer Vorteil der Erfindung ist nämlich auch darin zu sehen, daß die Nukleinsäuren sowohl noch an den Polymerpartikeln als auch nach der Abtrennung von den Polymerpartikeln im Elutionspuffer unmittelbar zu einer PCR Reaktion eingesetzt werden können. Die PCR-Reaktion oder/und die Identifizierung der Nukleinsäuren z.B. durch Sequenzierung können nach an sich bekannten Methoden durchgeführt werden.

Durch die erfindungsgemäßen Verfahren sowie den erfindungsgemäßen Reagenzienkit werden einfach und leicht automatisierbare Möglichkeiten zur Probenvorbereitung für die PCR bereitgestellt, die eine erhebliche weitere Vereinfachung bei der Analyse von Nukleinsäurehaltigen Proben darstellen und insbesondere mit einem erfindungsgemäßen Laborroboter ausgeführt werden können.

- 18 -

Die Erfindung wird im folgenden an Ausführungsbeispielen und an Hand der beigefügten Zeichnungen näher erläutert werden. Es stellt dar:

- 5 Fig. 1 eine Perspektivansicht einer ersten Ausführungsform eines erfindungsgemäßen Labor-Roboters;
- 10 Fig. 2 eine Ansicht zur Erläuterung des Aufbaus eines Roboterarms einer zweiten Ausführungsform eines erfindungsgemäßen Labor-Roboters;
- 15 Fig. 3 eine Seitenansicht einer Greifvorrichtung;
- 20 Fig. 4 eine geschnittene Seitenansicht einer Angriffseinheit, die allen erfindungsgemäßen Funktionseinheiten gemeinsam ist;
- 25 Fig. 5a eine als Gabelrahmen ausgebildete Funktionseinheit;
- 30 Fig. 5b eine Ansicht zur Erläuterung der Funktion des Gabelrahmens gemäß Fig. 5a;
- 35 Fig. 6 eine grobschematische Ansicht einer als Pipettenspitzenenträger ausgebildeten Funktionseinheit;
- 40 Fig. 7a eine grobschematische Ansicht zur Erläuterung der Funktion einer als Magnetvorrichtung ausgebildeten Funktionseinheit;
- 45 Fig. 7b eine abgewandelte Ausführung der Magnetvorrichtung gemäß Fig. 7a; und
- 50 Fig. 8 eine grobschematische Ansicht einer als Barcode-Leser ausgebildeten Funktionseinheit;

- 19 -

In Fig. 1 ist ein erfindungsgemäßer Labor-Roboter allgemein mit 10 bezeichnet. Er umfasst eine Grundplatte 12 mit einer Arbeitsfläche 14 sowie ein Gehäuse 16, in welchem zwei Roboterarme 18 und 20 verschiebbar gelagert sind. Ferner ist in dem Gehäuse 16 eine Steuereinheit 22 zur Steuerung
5 bzw. Regelung der Bewegung der Roboterarme 18, 20 untergebracht.

Die beiden Roboterarme 18, 20 weisen jeweils einen Hauptarm 18a bzw. 20a auf, der sich im Wesentlichen orthogonal zu einer im Wesentlichen vertikalen Frontfläche 16a des Gehäuses 16 erstreckt und dessen eines
10 Ende in dem Gehäuse 16 längs einer Bahn 24 horizontal hin- und herbewegbar ist (Bewegung in Y-Richtung). An jedem der Hauptarme 18a, 20a ist ein sich im Wesentlichen vertikal, d.h. in Z-Richtung, erstreckender Nebenarm 18b, 20b angeordnet, der zum einen längs des zugehörigen Hauptarms 18a bzw. 20a verlagert werden kann (Bewegung in X-Richtung)
15 und zum anderen in Vertikalrichtung verstellt werden kann (Bewegung in Z-Richtung). Bei dem Labor-Roboter 10 handelt es sich also um einen typischen Vertreter des Typs kartesischer XYZ-Labor-Roboter.

Am unteren Ende des Nebenarms 18b bzw. 20b ist eine erfindungsgemäße Greifvorrichtung 26 angebracht, deren Betrieb ebenfalls von der Steuereinheit 22 gesteuert bzw. geregelt werden kann und deren Aufbau weiter
20 unten an Hand von Fig. 3 näher erläutert werden wird. Mit Hilfe der Greifvorrichtungen 26 kann eine Reihe von Funktionseinheiten, die in Parkbereichen 28 der Arbeitsfläche 14 abgestellt sind und deren Aufbau und Funktion mit Bezug auf Fig. 4 bis 8 näher erläutert werden wird, aufgenom-
25 men und zur Behandlung von Proben eingesetzt werden. Die die Proben aufnehmenden Mikrotitrationsplatten 30 (siehe Fig. 5b) können beispielsweise in Abstellbereichen 34, 36 der Arbeitsfläche 14 bereitgestellt und mittels des Roboterarms 18 bzw. 20 in einen Bearbeitungsbereich 38 transportiert werden. Nach Abschluss der Behandlung der Proben können die
30 Mikrotitrationsplatten 30 dann wieder zu einem der Abstellbereiche 34, 36 gebracht werden.

- 20 -

In Fig. 2 ist lediglich der Vollständigkeit halber der Roboterarm 118 einer anderen Art von Labor-Roboter dargestellt. Der Roboterarm 118 weist einen Schlitten 118c auf, der längs einer Schiene 124 linearbeweglich gelagert ist. Der Hauptarm 118a und der Nebenarm 118b des Roboterarms 118 sind ähnlich wie ein menschlicher Ober- bzw. Unterarm am Schulter- bzw. Ellenbogengelenk an dem Schlitten 118c bzw. aneinander verschwenkbar gelagert. Am freien Ende des Unterarms 118b ist eine Greifvorrichtung 126 angeordnet.

Die Greifvorrichtung 26 bzw. 126 kann, wie vorstehend bereits erläutert worden ist, so ausgeführt sein, wie dies aus der EP-A-O 734 768 (bzw. der DE-U-295 05 652, der DE-U-295 05 707 oder der DE-U-295 15 990) oder aus der DE-A-198 01 178 hervorgeht. D.h. sie ist längs einer im Gebrauch im Wesentlichen vertikal verlaufenden Achse A länglich ausgebildet und umfasst gemäß Fig. 3 eine Greifzange 40 sowie ein Gehäuse 42. In dem Gehäuse 42 ist eine Betätigungsvorrichtung 44 aufgenommen, welche das Öffnen und Schließen der Greifzange durch eine Bewegung eines Stellglieds 46 in Richtung der Achse A steuert.

Die Betätigungsvorrichtung 44 kann dabei gemäß der DE-A-198 01 178 als aktive Betätigungsvorrichtung ausgebildet sein, welche die Bewegung des Stellglieds 46 mittels eines Kraftgeräts, beispielsweise eines Elektromagneten, herbeiführt. Es ist jedoch auch möglich, die Betätigungsvorrichtung 44 gemäß der EP-A-O 734 768 als passive Betätigungsvorrichtung auszuführen, welche die Bewegung des Stellglieds 46 nach Art eines Kugelschreibers oder Druckbleistifts aus einer Bewegung der Greifvorrichtung ableitet. In beiden Fällen ermöglicht jedoch die Tatsache, dass die Greifzange im Wesentlichen innerhalb einer Projektion P des Gehäuses 42 in Richtung der Achse A angeordnet ist, einen in horizontaler Richtung schlanken Aufbau der Greifvorrichtung 26 bzw. 126, was deren Bewegung im Bereich der Arbeitsfläche 14 des Labor-Roboters 10 erleichtert.

- 21 -

Sämtliche nachfolgend noch zu erläuternden Funktionseinheiten weisen eine Angriffseinheit 50 (siehe Fig. 4) auf, die ausschließlich dazu bestimmt ist, mit der Greifvorrichtung 26, 126 zusammenzuwirken. Die Angriffseinheit 50 verfügt zum einen über eine Zapfenhülse 52, wie sie beispielsweise aus der
5 EP-A-O 734 769 von den Deckeln her bekannt ist, welche die die Proben aufnehmenden Gefäße verschließen. An dem Zapfen 52a dieser Zapfenhülse 52 greift die Greifzange 40 der Greifvorrichtung 26, 126 an, um die Funktionseinheit aufzunehmen und zu einer bestimmten Position des Arbeitsbereichs 14 des Labor-Roboters zu bewegen.

10 Nachdem sowohl die Greifzange 40 als auch die Zapfenhülse 52 im Wesentlichen rotationssymmetrisch ausgebildet sind, ist die Angriffseinheit 50 ferner mit einem Positionierstab 54 versehen, der bei der Annäherung der Greifvorrichtung 26, 126 an die Funktionseinheit in eine Aufnahmeöffnung
15 48 eingeführt wird, die am Gehäuse 42 der Greifvorrichtung 26, 126 ausgebildet bzw. angeordnet ist. Dieser Eingriff von Positionierstab 54 und Aufnahmeöffnung 48 stellt sicher, dass die Funktionseinheit beim Verfahren im Arbeitsbereich 14 des Labor-Roboters 10 bzw. bei der Durchführung ihrer bestimmungsgemäßen Funktion stets die gewünschte Relativorientie-
20 rung bezüglich der Greifvorrichtung 26, 126 bzw. bezüglich des gesamten Labor-Roboters 10 beibehält. Zur Erleichterung des Einführens der Positionierstabs 54 in die Aufnahmeöffnung 48 sind sowohl am Positionierstab 54 als auch an der Aufnahmeöffnung 48 Einweisungsschrägflächen 54a bzw. 48a ausgebildet.

25 Die Tatsache, dass die Zapfenhülse 52 genauso ausgebildet ist, wie die Deckel, welche die die Proben aufnehmenden Gefäße verschließen, hat den Vorteil, dass die Greifvorrichtung 26, 126 sowohl zum Transport der Funktionseinheiten als auch zum Verdeckeln der Probengefäße verwendet
30 werden kann. Vom Material her sind die beide Zapfenhülsen jedoch unterschiedlich. Während die Deckel üblicherweise aus verformbarem Kunststoff, beispielsweise Polypropylen oder dergleichen, hergestellt sind, wird die

- 22 -

Zapfenhülse 52 der Angriffseinheit 50 bevorzugt aus Metall gefertigt sein, um der höheren mechanischen Beanspruchung genüge leisten zu können.

5 Festzuhalten ist, dass die Aufnahmeöffnung 48 nicht notwendigerweise eine allseits umschlossene Öffnung zu sein braucht. Vielmehr genügt es, wenn sie im Zusammenspiel mit dem Positionierstab 54 eine Drehung der Funktionseinheit um die Achse A der Greifvorrichtung 26, 126 verhindert. Hierzu sind lediglich zur Umfangsrichtung um die Achse A im Wesentlichen ortho-
gonal verlaufende Anschlagflächen erforderlich.

10 Festzuhalten ist ferner, dass es grundsätzlich auch möglich ist, den Positionierstab an der Greifvorrichtung und die Aufnahmeöffnung an der Funktionseinheit vorzusehen. Insbesondere im Hinblick auf den Einsatz der Greifvorrichtung 26, 126 zum Verdeckeln der Probengefäße ist jedoch die
15 in Fig. 3 und 4 dargestellte Ausführung bevorzugt.

In Fig. 5a ist ein Gabelrahmen 60 als ein erstes Beispiel einer bei dem erfindungsgemäßen Labor-Roboter 10 einsetzbaren Funktionseinheit dargestellt, die nach Art der Gabel eines Gabelstaplers zum Transport von
20 Mikrotitrationsplatten 30 aus den Abstellbereichen 34, 36 der Arbeitsfläche 14 des Labor-Roboters zum Behandlungsbereich 38 und umgekehrt dient. Der Gabelrahmen 60 ist im Wesentlichen U-förmig ausgebildet, wobei am Basisschenkel 60c der U-Form die Angriffseinheit 50 angebracht bzw. ausgebildet ist, während die beiden anderen Schenkel 60a und 60b die
25 Zinken der Aufnahmegabel bilden.

Wie in Fig. 5b gezeigt, werden die Mikrotitrationsplatten 30 bevorzugt auf Lagerböcken 62 abgestellt. Der hierdurch zwischen der Arbeitsfläche 14 und der Mikrotitrationsplatte 30 vorhandene Abstand erleichtert das
30 Untergreifen der Mikrotitrationsplatte 30 durch den Gabelrahmen 60. Darüber hinaus können die Lagerböcke 62 zum Temperieren, d.h. Kühlen oder Erwärmen, der Mikrotitrationsplatten 30 genutzt werden. Mit Hilfe von

- 23 -

den Lagerböcken 62 entsprechenden Lagerstangen können in den Abstellbereichen 34 und 36 schließlich sogenannte "Hotels" realisiert werden, in denen eine Mehrzahl von Mikrotitrationsplatten 30 in Übereinanderanordnung aufgenommen werden können.

5 Beim Transport ruht die Mikrotitrationsplatte 30 auf einer oberen Fläche 60d der Schenkel 60a, 60b und 60c des Gabelrahmens 60. Um ein unbeabsichtigtes Herabrutschen der Mikrotitrationsplatte 30 von dem Gabelrahmen 60 verhindern zu können, sind diese Schenkel an ihren Außenseiten mit einem
10 Steg 60e versehen, der sich in dem dargestellten Ausführungsbeispiel über die gesamte Länge der Schenkel 60a und 60b und in den Endbereichen des Basisschenkels 60c erstreckt.

15 Der Gabelrahmen 60 ist eines der wichtigsten Module für Laborroboter, da die sichere Bewegung von Mikrotitrationsplatten, die als Reaktionsgefäße, als Probengefäße und andere Aufgaben benutzt werden, eine wichtige Aufgabe bei der Automatisierung von Laborprozessen darstellt.

20 Als weiteres Beispiel einer bei dem erfindungsgemäßen Labor-Roboter 10 einsetzbaren Funktionseinheit ist in Fig. 6 grobschematisch ein Pipettenspitzenhalter 70 dargestellt. Unterhalb der Zapfenhülse 52 ist eine Andockeinheit 72 zur lösbaren Aufnahme von Pipettenspitzen 74 angeordnet. Ein von einer (nicht dargestellten) Pipettiereinheit kommender Schlauch 76 mündet in die untere Fläche 72a der Andockeinheit 72. Der von der Greifvorrichtung 26, 126 ergriffene Pipettenspitzenhalter 70 bildet zusammen mit
25 dem Roboterarm 18 bzw. 118 einen herkömmlichen Pipettier-Roboter. Daher brauchen der genaue Aufbau und die genaue Funktion der Andockeinheit 72 hier nicht näher erläutert zu werden.

30 Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Automatisierung von Laborprozessen ist die Magnetseparation. In der Molekularbiologie werden häufig mit bestimmten Reagenzien beschichtete Magnetpartikel als Festphase benutzt.

- 24 -

Die Magnetpartikel besitzen dabei in der Regel einen Durchmesser von zwischen etwa $0,5\ \mu\text{m}$ und etwa $50\ \mu\text{m}$ und befinden sich in dem Probenvolumen, das einen Inhalt in der Größenordnung von 1 ml bis 500 ml, vorzugsweise 30 ml bis 100 ml, haben kann, üblicherweise in Suspension.

5

Bei der Magnetseparation geht es nun darum, diese Magnetpartikel an den Wandungen des Probengefäßes abzuscheiden, um anschließend die im Probenvolumen zurückbleibenden Überstände beispielsweise durch die vorstehend beschriebene Pipettier-Funktionseinheit 70 entfernen zu können.

10

Hierzu muss das Reaktionsgefäß an einen Magneten, in der Regel einen Permanentmagneten, beispielsweise aus Neodyn, herangeführt werden. Derartige auch für den Einsatz bei Verbundgefäßen geeignete Magnetsysteme können beispielsweise von der Anmelderin bezogen werden. Ferner sei auf die WO-A-92/04961 verwiesen. Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Labor-

15

Roboters 10 können die Mikrotitrationsplatten 30 problemlos auf einen solchen Magnetseparator gestellt werden. Nach dem Abpipettieren der Überstände können die Mikrotitrationsplatten 30 dann zum Waschen der Magnetpartikel wieder in einen Abstellbereich 34, 36 zurücktransportiert werden.

20

Eine weitere Variante der Magnetseparation ist in Fig. 7a dargestellt, welche zur Erläuterung des Aufbaus und der Funktion einer Magnetseparations-Funktionseinheit 80 dient. Unterhalb ihrer Angriffseinheit 50 weist die Magnetseparations-Funktionseinheit 80 einen Permanentmagneten 82 auf, der beispielsweise aus Neodyn gefertigt sein kann. Dieser Permanentmagnet 82 kann mit Hilfe des Roboterarmes 18 unter der Steuerung/Regelung durch die Steuereinheit 22 an den oberen Bereich 84a eines Reaktionsgefäßes 84 angenähert werden. Dort verharret er für eine gewisse Zeit, die stark vom Durchmesser des Reaktionsgefäßes abhängt und üblicherweise in der Größenordnung von 10 Sekunden bis 5 Minuten liegt. Danach kann der Permanentmagnet 82 in einer Mehrzahl von Schritten entlang eines Fahrweges 86 bewegt werden, wobei er immer wieder verharret, um sicherzu-

25

30

- 25 -

stellen, dass alle bislang aufgesammelten Magnetpartikel an der Wandung des Reaktionsgefäßes nachgerutscht sind. Auf diese Weise befinden sich am Ende des Fahrwegs 86 alle Magnetpartikel in der Spitze 84b des Reaktionsgefäßes 84.

Wie in Fig. 7b grobschematisch dargestellt ist, kann die Magnetseparations-Funktionseinheit 180 auch eine Mehrzahl von Permanentmagneten 182 aufweisen, die in einer Halterung 188 um eine Öffnung 188a für das Reaktionsgefäß herum angeordnet sind. Auch mit diesem Magnetseparator 180 können die Magnetpartikel am Boden des Reaktionsgefäßes gesammelt werden.

Schließlich ist in Fig. 8 eine Barcode-Leseinheit 90 dargestellt, welche einen an der Angriffseinheit 50 angebrachten Barcode-Leser 92 umfasst. Die den Barcode-Leser 92 mit der Steuereinheit 22 verbindenden Datenleitungen sind in Fig. 8 der Übersichtlichkeit halber nicht gezeigt. Barcode-Leser spielen bei der Automatisierung von Laborprozessen eine große Rolle, da die Kennzeichnung von Proben mittels Barcodes immer üblicher wird, um eine eindeutige Identifizierung zu ermöglichen. In komplexen Roboterumgebungen ist es daher erforderlich, die von einem Barcode-Leser 92 bereitgestellten Informationen an die Steuereinheit, die beispielsweise von einem Computer, etwa einem PC, gebildet sein kann, zu übermitteln und dort bei der Steuerung der Bewegungen des Roboterarms 18 bzw. 20 sowie der weiteren Prozessabläufe zu berücksichtigen. Nur so kann sichergestellt werden, dass stets die richtige Probe der richtigen Behandlung unterzogen wird.

Beispiele

1.) Bindung von λ -HindIII-Marker-DNA an Magnetpartikel, beschichtet mit Carboxylgruppen, als Adsorber und magnetischer Abscheidung.

0,5 μg λ -HindIII-Marker-DNA in 10 μl bidest. Wasser wurden in einer Thermosprint-Platte [Fa. Innova, Mannheim] mit einer Arbeitslösung hergestellt aus 250 μg Partikeln aus Polyvinylalkohol (hergestellt nach EP 0

- 26 -

843 591) in 5 μ l bidest. Wasser, 5 μ l Proteinase K-Lösung [1 373 196, Fa. Roche, Mannheim] und 130 μ l BILATEST-Lysepuffer 1 (SDS) bestehend aus 5% Natriumdodecylsulfat [L4390, Fa. Sigma, München], 100 mM Tris/HCl [T2584, Fa. Sigma, München], 10 mM EDTA [E5134, Fa. Sigma, München], 0% bis 80% Ethanol [5054.1, Fa. Roth, Karlsruhe] versetzt.

Anschließend werden die Partikel mit einem Magneten abgetrennt, der Überstand abgenommen und die Partikel mit 150 μ l 80% Ethanol [5054.1, Fa. Roth, Karlsruhe] in bidest. Wasser gewaschen. Dieser Vorgang wird einmal wiederholt; danach werden die Partikel in 150 μ l BILATEST-Elutionspuffer bestehend aus 10 mM Tris/HCl pH 7,0 [s.o.] und 1 mM EDTA [s.o.] resuspendiert, bei 65°C für 5 min inkubiert und mit einem Magneten wie zuvor abgetrennt. Die gereinigte Nukleinsäure wird im Überstand abgenommen. Die Analyse in einem Standard-Agaroseflachbettgel (0,8 % Agarose [A9311, Fa. Sigma, München]) ergibt ein Bild wie Fig. 9.

Fig. 9

Spur	Inhalt
1, 2	Eluat aus Beispiel 1, Lysepuffer mit 0% Ethanol
3, 4	Eluat aus Beispiel 1, Lysepuffer mit 10% Ethanol
5, 6	Eluat aus Beispiel 1, Lysepuffer mit 20% Ethanol
7, 8	Eluat aus Beispiel 1, Lysepuffer mit 30% Ethanol
9, 10	Eluat aus Beispiel 1, Lysepuffer mit 40% Ethanol
11, 12	Eluat aus Beispiel 1, Lysepuffer mit 50% Ethanol
13, 14	Eluat aus Beispiel 1, Lysepuffer mit 60% Ethanol
15, 16	Eluat aus Beispiel 1, Lysepuffer mit 70% Ethanol
17, 18	Eluat aus Beispiel 1, Lysepuffer mit 80% Ethanol
M	Marker (λ -HindIII): 23,1 9,4 6,6 4,4 2,3 2,0 0,56 KB

Die Bindung der DNA an die Magnetpartikel ist deutlich abhängig von der Ethanol-Konzentration, unter 50 % Ethanolkonzentration ist kaum Bindung zu beobachten.

- 27 -

2.) Isolierung von Nukleinsäure aus Hefe mit Partikeln, beschichtet mit Carboxylgruppen, als Adsorber und Zentrifugation.

Zunächst wird für einen Testansatz eine Arbeitslösung hergestellt aus 250
5 μg Partikeln aus Polyvinylalkohol (hergestellt nach EP 0 843 591) in 5 μl
bidest. Wasser, 5 μl Proteinase K-Lösung [1 373 196, Fa. Roche,
Mannheim] und 130 μl BILATEST-Lysepuffer I (SDS) bestehend aus 5 %
Natriumdodecylsulfat [L4390, Fa. Sigma, München], 100 mM Tris/HCl
[T2584, Fa. Sigma, München], 10 mM EDTA [E5134, Fa. Sigma,
10 München], 50 % Ethanol [5054.1, Fa. Roth, Karlsruhe].

Für einen Testansatz werden 10^8 Hefe-Zellen (*Saccharomyces cerevisiae*)
in 10 μl Volumen in einer Thermosprint-Platte [Fa. Innova, Mannheim] mit
140 μl dieser Arbeitslösung versetzt und 15 min. bei 37°C inkubiert.
Anschließend werden die Partikel in einer Zentrifuge [Nr. 5810R; Fa.
15 Eppendorf, Hamburg] für 2 min, 1000 rpm in einem
Mikrotitrationsplattenrotor [Nr. A-4-62; Fa. Eppendorf, Hamburg]
zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Partikel mit 150 μl 80 %
Ethanol [5054.1, Fa. Roth, Karlsruhe] in bidest. Wasser gewaschen. Dieser
Vorgang wird einmal wiederholt; danach werden die Partikel in 150 μl
20 BILATEST-Elutionspuffer bestehend aus 10 mM Tris/HCl pH 7,0 [s.o.] und
1 mM EDTA [s.o.] resuspendiert, bei 65°C für 10 min inkubiert und durch
Zentrifugation wie zuvor abgetrennt. Die gereinigte Nukleinsäure wird im
Überstand abgenommen. Die Analyse in einem Standard-
Agaroseflachbettgel (0,8 % Agarose [A9311, Fa. Sigma, München]) ergibt
25 ein Bild wie Fig. 10.

Fig. 10

Spur Inhalt

1	Eluat aus Beispiel 2
30 2	Wiederholung Spur 1
M	Marker (λ -HindIII): 23,1 9,4 6,6 4,4 2,3 2,0 0,56 KB

- 28 -

3.) Isolierung von Nukleinsäure aus Hefe mittels Magnetpartikel, beschichtet mit Carboxylgruppen, als Adsorber und magnetischer Abscheidung.

Beispiel 2 wurde wiederholt, statt der Zentrifugation wurden die Partikel jedoch mit einem Dauermagnet [Fa. Rheinmagnet, Neunkirchen] abgetrennt.

Als Ergebnis wurde das Eluat mit einem Standard-Agaroseflachbettgel (0,8 % Agarose [s.o.] analysiert und in Fig. 11 dargestellt.

Fig. 11

Spur Inhalt

M Marker (λ -HindIII): 23,1 | 9,4 | 6,6 | 4,4 | 2,3 | 2,0 | 0,56 KB

1 Eluat aus Beispiel 3

2 Wiederholung Spur 1

4.) Isolierung von Nukleinsäure aus Hefe mittels Magnetpartikel, beschichtet mit Carboxylgruppen, als Adsorber und magnetischer Abscheidung.

Beispiel 3 wurde wiederholt, wobei die Elution nicht bei 65°C, sondern bei Raumtemperatur durchgeführt wurde.

Als Ergebnis wurde das Eluat mit einem Standard-Agaroseflachbettgel (0,8 % Agarose [s.o.] analysiert und in Fig. 12 dargestellt.

Fig. 12

Spur Inhalt

1 Eluat aus Beispiel 4

2 Wiederholung Spur 1

M Marker (λ -HindIII): 23,1 | 9,4 | 6,6 | 4,4 | 2,3 | 2,0 | 0,56 KB

- 29 -

5.) Isolierung von Nukleinsäure aus Hefe mittels Magnetpartikel, beschichtet mit Carboxylgruppen, als Adsorber und magnetischer Abscheidung.

- 5 Beispiel 3 und 4 wurden im direkten Vergleich wiederholt.
Als Ergebnis wurde das Eluat mit einem Standard-Agaroseflachbettgel (0,8 % Agarose [s.o.]) analysiert und in Fig. 13 dargestellt.

Fig. 13

10 *Spur Inhalt*

M Marker (λ -HindIII): 23,1|9,4|6,6|4,4|2,3|2,0|0,56 KB

1, 2 Eluat aus Beispiel 5, Elution bei RT

3, 4 Eluat aus Beispiel 5, Elution bei 65°C

- 15 Die Elution bei RT führt zu einer geringeren Elution von kleineren Nukleinsäure-Molekülen, z.B. RNA (die unteren beiden Banden in Spur 3 und 4). Diese Selektivität kann zur Trennung von verschiedenen Nukleinsäuremolekülen ausgenutzt werden.

20

6.) Isolierung von Nukleinsäure aus Hefe mittels Magnetpartikel, beschichtet mit Carboxylgruppen, als Adsorber und magnetischer Abscheidung.

- 25 Beispiel 3 wurde wiederholt, wobei Lysepuffer mit SDS oder mit CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid, 9161.1, Fa. Roth, Karlsruhe) verglichen wurden, jeweils mit 50 % Ethanol oder ohne Ethanol.
Als Ergebnis wurde das Eluat mit einem Standard-Agaroseflachbettgel (0,8 % Agarose [s.o.]) analysiert und in Fig. 14 dargestellt.

kein Salz!

30

- 30 -

Fig. 14

Spur Inhalt

- M Marker (λ -HindIII): 23,1 | 9,4 | 6,6 | 4,4 | 2,3 | 2,0 | 0,56 KB
- 1, 2 Eluat aus Beispiel 6, Lysepuffer mit 5 % SDS
- 3, 4 Eluat aus Beispiel 6, Lysepuffer mit 5 % SDS und 50 % Ethanol
- 5, 6 Eluat aus Beispiel 6, Lysepuffer mit 5 % CTAB
- 7, 8 Eluat aus Beispiel 6, Lysepuffer mit 5 % CTAB und 50 % Ethanol

CTAB kann statt SDS eingesetzt werden, ohne Ethanol findet jedoch in beiden Fällen keine Bindung der genomischen DNA statt. In Kontrollversuchen wurde gezeigt, dass der Zellaufschluss auch ohne Ethanol erreicht wird, die geringe Ausbeute bei den Proben ohne Ethanol ist daher auf die geringe Bindung der DNA in Abwesenheit von Ethanol zurückzuführen.

7.) Isolierung von Nukleinsäuren aus EDTA-Kaninchenvollblut mittels Magnetpartikel, beschichtet mit Carboxylgruppen, als Adsorber und Guanidiniumthiocynat-Lösung

Zunächst wird für einen Testansatz eine Arbeitslösung hergestellt aus 250 μ g Partikeln aus Polyvinylalkohol (hergestellt nach EP 0 843 591) in 5 μ l bidest. Wasser, 5 μ l Proteinase K-Lösung (1 373 196, Fa. Roche, Mannheim) und 130 μ l BILATEST-Lysepuffer II (Gu-SCN) bestehend aus 6 M Guanidiniumthiocynat [G9277, Fa. Sigma, München], 100 mM Tris/HCl [T2584, Fa. Sigma, München], 1 mM EDTA [E5134, Fa. Sigma, München], 2,5 % Natriumlaurylsulfat (L9150 Fa. Sigma, München), pH 7,0.

10 μ l EDTA-Kaninchenvollblut werden mit 140 μ l der zuvor beschriebenen Arbeitslösung versetzt und 15 min bei 37 °C verschlossen inkubiert.

Anschliessend werden die Partikel mit einem Dauermagnet auf den Boden gezogen und der Überstand abgenommen. Die Partikel werden mit 150 μ l 80 % Ethanol [5054.1, Fa. Roth, Karlsruhe] in bidest. Wasser gewaschen.

- 31 -

Dieser Vorgang wird einmal wiederholt; danach werden die Partikel in 150 μ l BILATEST-Elutionspuffer bestehend aus 10 mM Tris/HCl pH 7,0 [s.o.] und 1 mM EDTA [s.o.] resuspendiert, bei 65 °C für 10 min inkubiert, wie zuvor abgetrennt und die gereinigte Nukleinsäure im Überstand
 5 abgenommen. Die Analyse in einem Standardagaroseflachbettgel (0,8 % Agarose [Fa. Sigma, München] ergibt ein Bild wie Fig. 15.

Fig. 15

Spur Inhalt

10	M	Marker (λ -HindIII): 23,1 9,4 6,6 4,4 2,3 2,0 0,56 KB
	1	Eluat aus Beispiel 7 unverdünnt
	2	Wiederholung Spur 1
	3	Eluat aus Beispiel 7 1 : 10 verdünnt
	4	Wiederholung Spur 3

15

8.) Isolierung von Nukleinsäuren aus einem Gemisch von EDTA-Kaninchenvollblut und Hefezellen mittels Magnetpartikeln, beschichtet mit Carboxylgruppen, als Adsorber.

20

10⁸ Hefezellen in 10 μ l EDTA-Kaninchenblut wurden sowohl wie Beispiel 3 als auch wie Beispiel 7 behandelt. Die Analyse in einem Standardagaroseflachbettgel (0,8 % Agarose [s.o]) ergibt ein Bild wie Fig. 16.

25

Fig. 16

Spur Inhalt

	1	Eluat aus Beispiel 8 mit Lysepuffer aus Beispiel 2
	2	Wiederholung Spur 1
30	3	Eluat aus Beispiel 8 mit Lysepuffer aus Beispiel 7
	4	Wiederholung Spur 3
	M	Marker (λ -HindIII): 23,1 9,4 6,6 4,4 2,3 2,0 0,56 KB

- 32 -

Aus dieser Darstellung ergibt sich der Hinweis, dass sich die Hefezellen mit dem SDS-Lysepuffer aus Beispiel 1 und 2 selektiv lysieren lassen, während Vollblut sich selektiv mit dem Guanidin-Puffer aus Beispiel 4 lysieren lässt.

5

9.) Isolierung von Nukleinsäuren aus humanem EDTA-Vollblut mittels Magnetpartikeln, beschichtet mit Carboxylgruppen, als Adsorber und Guanidiniumthiocyanat-Lösung

10 Beispiel 7 wurde mit humanem Vollblut wiederholt. Die Analyse in einem Standardagaroseflachbettgel (0,8 % Agarose [Fa. Sigma, München]) ergibt ein Bild wie Fig. 17.

Fig. 17

15 **Spur Inhalt**

- | | |
|------|----------------------------------------------------------------------------|
| 1 | Eluat aus Beispiel 9 mit Lysepuffer aus Beispiel 7 |
| 2 | Wiederholung Spur 1 |
| M | Marker (λ -HindIII): 23,1 9,4 6,6 4,4 2,3 2,0 0,56 KB |
| 3 | Eluat aus Beispiel 9 mit Lysepuffer aus Beispiel 2 |
| 20 4 | Wiederholung Spur 3 |

25 **10.) Isolierung von Nukleinsäuren aus der humanpathogenen Hefe *Candida albicans* mittels Magnetpartikeln, beschichtet mit Carboxylgruppen, als Adsorber**

Der Versuch aus Beispiel 4 wurde mit 10^8 Zellen der humanpathogenen Hefe *Candida albicans* wiederholt. Diese Hefe zeichnet sich durch eine besonders starke und schwer zu lysierende Zellwand aus.

30 Als Ergebnis wurde das Eluat mit einem Standard-Agaroseflachbettgel (0,8 % Agarose [s.o.] analysiert und in Fig. 18 dargestellt.

- 3 3 -

Fig . 1 8

Sp u r h i n a l tM Marker (λ -HindIII): 23,1|9,4|6,6|4,4|2,3|2,0|0,56 KB

1 Eluat aus Beispiel 10

5 2 Wiederholung Spur 1

11.) Isolierung von Nukleinsäuren aus dem gram-positiven Bakterium *Lactococcus lactis* mittels Magnetpartikeln, beschichtet mit Carboxylgruppen, als Adsorber

Der Versuch aus Beispiel 4 wurde mit dem gram-positiven Bakterium *Lactococcus lactis* wiederholt. Gram-positive Bakterien besitzen ebenfalls eine besonders starke und schwer zu lysierende Zellwand. Es wurden Lysezeiten von 1 min bis 15 min verwendet.

Als Ergebnis wurde das Eluat mit einem Standard-Agaroseflachbettgel (0,8 % Agarose [s.o.] analysiert und in Fig. 19 dargestellt.

Fig. 19

Spur InhaltM Marker (λ -HindIII): 23,1|9,4|6,6|4,4|2,3|2,0|0,56 KB

1, 2 Eluat aus Beispiel 10, Lyse 1 min

3, 4 Eluat aus Beispiel 10, Lyse 5 min

5, 6 Eluat aus Beispiel 10, Lyse 10 min

7, 8 Eluat aus Beispiel 10, Lyse 15 min

Der Aufschluss verläuft sehr schnell, bereits nach 1 min erhält man eine hohe DNA-Ausbeute. Dies entspricht auch den Beobachtungen bei unseren Versuchen mit den Hefen, die ebenfalls schon nach 1 min aufgeschlossen werden konnten.

- 34 -

12.) Isolierung von Nuleinsäuren aus Hefe mittels Agarose-Partikeln beschichtet mit Glutaminsäure

Der Versuch aus Beispiel 4 wurde mit Agarosepartikeln, beschichtet mit Glutaminsäure (G2759, Fa. Sigma, München) wiederholt. Das Ergebnis war ähnlich dem in Fig. 12 gezeigten Ergebnis von Beispiel 4, allerdings war die Ausbeute wesentlich geringer.

13.) PCR-Experimente

a) Hefe

Mit der isolierten Hefe-DNA aus Beispiel 3 wird eine PCR (US 4 683 195) mit den Primern

KV80: 5'-GCG GAT CCT TAA GTC CAA TCG TCA AAA TT-3'
KV102: 5'-GCG AAT TCG TAT CTT CTT TGC CCA AGG AA-3'

[Fa. MWG Biotech AG, Ebersberg bei München] durchgeführt. Mit diesen Primern wird ein 496 bp-Fragment aus dem BCYI-Gen der Hefe amplifiziert.

Die PCR-Ansätze enthalten die folgenden Bestandteile:

0,5 μ L	Primer-Lösung 1 (50 pmol μ L ⁻¹ in H ₂ O bidest)
0,5 μ L	Primer-Lösung 2 (50 pmol μ L ⁻¹ in H ₂ O bidest)
2 μ L	dNTP-Lösung, Konzentration der Nukleotide je 5 mM (Eurogentec, Seraing, Belgien)
4 μ L	MgCl ₂ -Lösung 25 mM (Eurogentec)
5 μ L	10 x PCR-Puffer (Eurogentec)
0,5 u	Taq-Polymerase (Eurogentec)
bis zu 30 μ L DNA- oder Probenlösung	

in einem Gesamtvolumen von 50 μ L. Während des Ansatzes wird die PCR-Platte auf 4°C gekühlt. Nach Zugabe der letzten Lösung werden die

- 35 -

Proben einmal mit einer Pipette gemischt. Die PCR wird in Thermosprint-Platten [Fa. Innova GmbH, Mannheim) im Primus 96 Plus [MWG Biotech AG, München] durchgeführt. Das Programm umfasst die folgenden Schritte:

- 5 Deckelheizung auf 110°C
- 3 min 94°C
- 27 Zyklen mit
 - 30 s 94°C
 - 30 s 50°C
 - 10 - 2 min 72°C
 - 5 min 72°C
 - Kühlung auf 4°C

Nach der PCR werden die Proben mit 15 - 20% Gel-Ladepuffer mit EDTA [Sigma, München] versetzt. Die Amplifikate wurde auf einem

15 Standardagarosegel (1,6 %) analysiert (in Fig. 20 dargestellt).

Fig. 20

Spur Inhalt

- 1 30 µL DNA-Lösung
- 20 2 Wiederholung von Spur 1
- 3 10 µL DNA-Lösung
- 4 Wiederholung von Spur 3
- 5 1 µL DNA-Lösung
- 6 Wiederholung von Spur 5
- 25 7 0,1 µL DNA-Lösung
- 8 Wiederholung von Spur 7
- 9 0,01 µL DNA-Lösung
- 10 10 Wiederholung von Spur 9
- 11 11 0,001 µL DNA-Lösung
- 30 12 Wiederholung von Spur 11

b) Humanblut

- 36 -

Mit der isolierten Human-DNA aus Beispiel 9 wird eine PCR (US 4 683 195) mit den Primern

β-Af: 5'-TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT GCC CAT CTA-3'

β-Ar: 5'-CTA GAA GCA TTT GCC GTG GAC GAT GGA GGG-3'

5

[Fa. MWG Biotech AG, Ebersberg bei München] durchgeführt. Mit diesen Primern wird ein 600 bp-Fragment aus dem β-Actin-Gen des Menschen amplifiziert.

Die PCR-Ansätze werden wie unter a) beschrieben vorgenommen.

10 Nach der PCR werden die Proben mit 15 - 20 % Gel-Ladepuffer mit EDTA [Fa. Sigma, München] versetzt. Die Amplifikate wurde auf einem Standardagarosegel (1,6 %) analysiert (in Fig. 21 dargestellt).

Fig. 21

15 **Spur Inhalt**

- | | |
|-------|---------------------------|
| 1 | 30 µL DNA-Lösung |
| 2 | Wiederholung von Spur 1 |
| 3 | 10 µL DNA-Lösung |
| 4 | Wiederholung von Spur 3 |
| 20 5 | 1 µL DNA-Lösung |
| 6 | Wiederholung von Spur 5 |
| 7 | 0,1 µL DNA-Lösung |
| 8 | Wiederholung von Spur 7 |
| 9 | 0,01 µL DNA-Lösung |
| 25 10 | Wiederholung von Spur 9 |
| 11 | 0,001 µL DNA-Lösung |
| 12 | Wiederholung von Spur 1 1 |
| M | Marker 100 bp-Leiter |

30 **14) Isolierung von Nukleinsäuren aus humanem EDTA-Vollblut mittels Magnetpartikel, beschichtet mit Carboxylgruppen, als Adsorber.**

- 37 -

Bei Blutprobenvolumen über 25 μ l erhöht ein vorgeschalteter Erythrozytenlyse-Schritt die Ausbeute an DNA wesentlich. Zur Erythrozytenlyse werden die Vollblutproben (EDTA-, Citrat- oder Heparin-Vollblut) vor der DNA-Isolierung im Verhältnis 1:1,4 mit
5 Erythrozytenlysepuffer (10mM Tris-HCl pH7,5 [T2584, Fa. Sigma, München], 300mM Saccharose [9097, Fa. Roth, Karlsruhe], 5mM MgCl₂ [M2670, Fa. Sigma, München], 1% Triton X-100 [3051, Fa. Roth, Karlsruhe]) gemischt und 30s bei 14.000g abzentrifugiert. Das Pellet wird einmal in demselben Puffer resuspendiert und anschliessend wieder
10 abzentrifugiert.

Zur DNA-Isolierung wird zunächst eine Arbeitslösung hergestellt aus 250 μ g Partikeln aus Polyvinylalkohol, hergestellt nach EP 0 843 591 in 5 μ l bidest. Wasser, 5 μ l Proteinase K ([1373196, Fa. Roche, Mannheim], 20mg ml⁻¹ in
15 10mM Tris-HCl pH7[s. o.]) und 130 μ l BILATEST-Lysepuffer II (Gu-SCN) bestehend aus 3 M Guanidiniumthiocyanat [G9277, Fa. Sigma, München], 3% Natriumlauroylsulfat [L9150, Fa. Sigma, München], 100 mM Tris/HCl pH7,0 [s. o.], 1 mM EDTA [E5134, Fa. Sigma, München], 50% Ethanol [9065, Fa. Roth, Karlsruhe].

20 10 μ l bzw. 25 μ l humanes Vollblut (EDTA-, Citrat- oder Heparin-Vollblut) werden mit 140 μ l der zuvor beschriebenen Arbeitslösung versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Bei Probenvolumen von 50 μ l und 100 μ l wird zunächst die oben beschriebene Erythrozytenlyse durchgeführt, das
25 Pellet wird nach der zweiten Zentrifugation in 140 μ l der zuvor beschriebenen Arbeitslösung resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend werden die Partikel mit einem Dauermagnet an die Wand
30 gezogen und der Überstand abgenommen. Die Partikel werden mit 150 μ l Waschpuffer (10mM Tris-HCl pH7,5 [s. o.], 1mM EDTA [s. o.], 80% Ethanol [s. o.]) gewaschen, wobei der DNA-Magnetpartikelkomplex nicht

- 38 -

resuspendiert wird.. Dieser Vorgang wird mindestens einmal wiederholt; danach wird der Komplex 5min luftgetrocknet, um Ethanolreste zu entfernen.

5 Zur Elution werden die Magnetpartikel in 150 μ l BILATEST-Elutionspuffer (10 mM Tris/HCl pH 7,0 [s.o.], 1 mM EDTA[s.o.]) oder Wasser resuspendiert, bei 65 °C für 5 min inkubiert und wie zuvor abgetrennt. Die gereinigt Nukleinsäure wird im Überstand abgenommen.

10 Die Analyse in einem Standardagaroseflachbettgel (0,8 % Agarose [Fa. Sigma, München] ergibt ein Bild wie Fig. 22.

Spur Inhalt

M	Marker (λ -HindIII): 23,1 9,4 6,6 4,4 2,3 2,0 0,56 KB
15 1	Eluat (Lysezeit 1min) aus Beispiel 1 unverdünnt
2	Wiederholung Spur 1
3	Eluat (Lysezeit 5min) aus Beispiel 1 unverdünnt
4	Wiederholung Spur 3
5	Eluat (Lysezeit 10min) aus Beispiel 1 unverdünnt
20 6	Wiederholung Spur 5
7	Eluat (Lysezeit 15min) aus Beispiel 1 unverdünnt
8	Wiederholung Spur 7

15) **Automatisierte Isolierung von Nukleinsäuren aus humanem**
 25 **EDTA-Vollblut mittels Magnetpartikel, beschichtet mit Carboxylgruppen, als Adsorber, und direkter Verwendung der Magnetpartikel (ohne Elution) als PCR-Template (HLA-SSP-PCR) unter Einsatz des BILATEC AUTOSPRINT-Pipettierroboters.**

30 Die automatisierte DNA-Isolierung aus EDTA-Vollblut wird mit dem BILATEST DNA 2-Reagenziensatz unter Einsatz des BILATEC AUTOSPRINT-Pipettierroboters durchgeführt.

- 39 -

Bei Probenvolumen über 25 μ l wird zur Erhöhung der DNA-Ausbeute ein Erythrozytenlyse-Schritt vorgeschaltet. Die Vollblutproben (EDTA-, Citrat- oder Heparin-Vollblut) werden hierzu vor der DNA-Isolierung im Verhältnis 1:1,4 mit Erythrozytenlysepuffer (10mM Tris-HCl pH7,5 [T2584, Fa. Sigma, München], 300mM Saccharose [9097, Fa. Roth, Karlsruhe], 5mM MgCl₂ [M2670, Fa. Sigma, München], 1% Triton X-100 [3051, Fa. Roth, Karlsruhe]) gemischt und 30s bei 14.000g abzentrifugiert. Optional wird das Pellet einmal in demselben Puffer resuspendiert und anschliessend wieder abzentrifugiert. Die Schritte der Erythrozytenlyse werden zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch manuell durchgeführt.

Zur DNA-Isolierung wird zunächst eine Arbeitslösung hergestellt aus 250 μ g Partikeln aus Polyvinylalkohol, hergestellt nach EP 0 843 591 in 5 μ l bidest. Wasser, 5 μ l Proteinase K ([1373196, Fa. Roche, Mannheim], 20mg ml⁻¹ in 10mM Tris-HCl pH7[s. o.]) und 130 μ l BILATEST-Lysepuffer II (Gu-SCN) bestehend aus 3 M Guanidiniumthiocyanat [G9277, Fa. Sigma, München], 3% Natriumlauroylsulfat [L9150, Fa. Sigma, München], 100 mM Tris/HCl pH7,0 [s. o.], 1 mM EDTA [E5134, Fa. Sigma, München], 50% Ethanol [9065, Fa. Roth, Karlsruhe]. Das Mischen der Arbeitslösung wird von dem Pipettierroboter AUTOSPRINT übernommen, der die Reagenzien aus den Vorratsflaschen im Reagenzienblock (Position 4) entnimmt und in einem speziellen Gefäss im selben Block mischt. Die Lösungen 1 (Magnetpartikel) und 2 (Proteinase K) werden vor der Entnahme mehrfach durch Aufnahme und Abgabe der Flüssigkeit gemischt. Die Lysemischung wird anschliessend vor der Verteilung ebenfalls auf dieselbe Weise gemischt.

10 μ l bzw. 25 μ l humanes Vollblut (EDTA-, Citrat- oder Heparin-Vollblut) werden durch den AUTOSPRINT aus der Probenposition (7) entnommen und in die Arbeitsplatte (Position 5) gegeben. Anschliessend werden die Ansätze 5 min bei Raumtemperatur inkubiert (Lyse). Bei Probenvolumen von 50 μ l und 100 μ l wird zunächst die oben beschriebene Erythrozytenlyse durchgeführt. Das Pellet nach der zweiten Zentrifugation wird durch den

- 40 -

AUTOSPRINT in 140 μ l der zuvor beschriebenen Arbeitslösung resuspendiert (mehrfache Aufnahme und Abgabe der Flüssigkeit), in die Arbeitsplatte transferiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

5 Anschließend werden die Partikel mit einem Dauermagnet an die Wand gezogen. Hierzu wird die Platte vom AUTOSPRINT auf den Magnetseparator überführt (Position 6), wobei der spezielle systemeigene Plattengreifer verwendet wird. Nach der Abtrennung der Magnetpartikel (1min) wird der Überstand abgesaugt. Die Platte wird wieder auf Position 5 transferiert,
10 anschliessend werden werden 150 μ l Waschpuffer (10mM Tris-HCl pH7,5 [s. o.], 1mM EDTA [s. o.], 80% Ethanol [s. o.]) zu den Partikeln gegeben, wobei der DNA-Magnetpartikelkomplex nicht zerstört wird.. Dieser Vorgang wird mindestens einmal wiederholt; danach wird der Komplex 5min luftgetrocknet (auf dem Magnetseparator, Position 6), um Ethanolreste zu
15 entfernen.

Nach der Lufttrocknung wird die Arbeitsplatte auf Position 5 transferiert. Die Partikel werden mit 100 μ l Elutionspuffer (10 mM Tris/HCl pH 7,0 [s.o.], 1 mM EDTA[s.o.]) oder Wasser versetzt und 3min bei Raumtemperatur
20 inkubiert. Anschliessend werden die Partikel durch mehrfache Aufnahme und Abgabe resuspendiert und direkt als PCR-Template eingesetzt. Die thermische Behandlung zur Elution sowie die Abtrennung der Magnetpartikel entfallen bei diesem Versuch, was zu einer wesentlichen Zeitersparnis führt. Die Magnetpartikel beeinflussen bis zu einer Endkonzentration im PCR-
25 Ansatz von 1 μ g μ l⁻¹ die PCR-Reaktion nicht.

Die Analyse in einem Standardagaroseflachbettgel (0,8 % Agarose [Fa. Sigma, München] ergibt ein Bild wie Fig. 23.

30 Erklärung zu Fig. 23:

Spur Inhalt

- 41 -

M Marker (λ -HindIII): 23,1|9,4|6,6|4,4|2,3|2,0| 0,56 KB

1 Beads nach Elution aus Beispiel 2, 10 μ l Blut

2 Beads nach Elution aus Beispiel 2, 25 μ l Blut

3 Beads nach Elution aus Beispiel 2, 50 μ l Blut, Erythrozytenlyse

5 4 Beads nach Elution aus Beispiel 2, 100 μ l Blut Erythrozytenlyse

6 Eluat aus Beispiel 2, 10 μ l Blut

6 Eluat aus Beispiel 2, 25 μ l Blut

7 Eluat aus Beispiel 2, 50 μ l Blut, Erythrozytenlyse

8 Eluat aus Beispiel 2, 100 μ l Blut Erythrozytenlyse

10 9 Beads ohne Elution aus Beispiel 2, 10 μ l Blut

10 Beads ohne Elution aus Beispiel 2, 25 μ l Blut

11 Beads ohne Elution aus Beispiel 2, 50 μ l Blut, Erythrozytenlyse

12 Beads ohne Elution aus Beispiel 2, 100 μ l Blut Erythrozytenlyse

15 Mit aus 50 μ l EDTA-Vollblut isolierter DNA wurde eine HLA-DRB-PCR durchgeführt (Biotest-Testkit). Bei der DNA-Isolierung wurde zunächst eine Erythrozytenlyse durchgeführt, die Magnetpartikelmenge wurde auf 100 μ g reduziert. Je 10 μ l PCR-Reaktion wurden 3 μ l Lösung mit resuspendierten Magnetpartikeln eingesetzt (Gesamtvolumen der resuspendierten
20 Magnetpartikel 100 μ l). Der Ansatz erfolgt so, dass die DNA mit einem fertigen Mastermix und Wasser gemischt wird und der entstandene Mix auf die PCR-Platte mit den getrockneten Primern verteilt wird. Dieser Schritt wird zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch manuell durchgeführt, soll aber auch automatisiert werden.

25 Die Analyse der PCR-Produkte (Programm nach der Vorschrift für den Biotest HLA-DRB-SSP-Kit) in einem Standardagaroseflachbettgel (1,6 % Agarose [Fa. Sigma, München] ergibt ein Bild wie Fig. 24.

30 Ablauf der automatisierten DNA-Isolierung aus humanem EDTA-Vollblut mit dem BILATEC AUTOSPRINT-Pipettierroboter

- 42 -

Notwendige Vorbereitungsschritte:

- a. Initialisieren des AUTOSPRINT-Roboters und der AUTOSPRINT FOCUS-Software.
- 5 b. Einsetzen der Racks mit Wechselspitzen (zur Vermeidung von Kontaminationen werden sterile Filterspitzen eingesetzt) und der THERMOSPRINT-Arbeitsplatte, Vorbereitung des Wechselspitzenabwurfs (Dekontaminationsbeutel).
- 10 c. Einsetzen der BILATEST DNA 2-Lösungen in den Reagenzienblock (Position 4, Flaschen werden nach Vorlageschema verteilt. Der Reagenzienblock nimmt je eine Flasche der Lösungen 1, 2, 3 oder 4 [je nach Probe] und 6 sowie zwei Flaschen der Lösung 5 auf. Ebenfalls im Reagenzienblock befindet sich die Flasche zum Mischen der gebrauchsfertigen Lyselösung durch den Roboter).
- 15 d. Einsetzen der Proben (in einer THERMOSPRINT-Platte, bis zu 96 Proben gleichzeitig).

Das Probenvolumen kann bis zu 25µl EDTA-Vollblut betragen (bei vorgeschalteter Erythrozytenlyse kann das Ausgangsvolumen bis 100µl EDTA-Vollblut betragen; das Pellet nach der Erythrozytenlyse wird entweder
20 manuell mit Wasser oder PBS resuspendiert [Volumen 25µl] oder vor der Verteilung der Proben vom AUTOSPRINT-Roboter in 50 - 100µl Elutionspuffer [Lösung 6] resuspendiert).

25 **Ablauf der automatisierten DNA-Isolierung:**

Mischen der Lyselösung (für N Proben [N + 2] x 140µl Lyselösung).

1. Entnahme der Magnetpartikelsuspension mit frischer Wechselspitze. Die Magnetpartikel (Position 4) werden zunächst durch fünfmalige
30 Aufnahme und Abgabe des vollen Wechselspitzenvolumens resuspendiert, anschliessend wird die benötigte Menge ([N + 2] x 5

- 43 -

μ l) entnommen und in das Gefäß für die LyseLösung (Position 4) überführt.

2. Entnahme der Proteinase K-Lösung mit frischer Wechselspitze. Die Lösung (Position 4) wird zunächst durch fünfmalige Aufnahme und Abgabe des vollen Wechselspitzenvolumens gemischt, anschliessend wird die benötigte Menge $([N + 2] \times 5\mu\text{l})$ entnommen und in das Gefäß für die LyseLösung (Position 4) überführt.

3. Entnahme des Lysepuffers mit frischer Wechselspitze (Position 4; benötigte Menge $[N + 2] \times 130\mu\text{l})$ und Überführung in das Gefäß für die LyseLösung (Position 4).

4. Mischen der gebrauchsfertigen LyseLösung durch fünfmalige Aufnahme und Abgabe des vollen Wechselspitzenvolumens (es wird die Wechselspitze von Schritt 3. verwendet).

Verteilen der Proben

5. Überführung mit einer frischen Wechselspitze je Probe von je 10 – 25 μ l Vollblut oder resuspendierten Erythrozytenlyse-Pellets aus der Probenplatte (Position 7) in die Arbeitsplatte (Position 5). Die Proben werden vor der Aufnahme durch einmalige Aufnahme und Abgabe gemischt. Falls die Erythrozytenlyse-Pellets nicht manuell resuspendiert wurden, werden durch den AUTOSPRINT-Roboter die Erythrozytenlyse-Pellets durch fünfmalige Aufnahme und Abgabe in 50 – 100 μ l Lysepuffer (Position 4) resuspendiert und anschliessend mit der selben Wechselspitze in die Arbeitsplatte (Position 5) überführt.

Lyse der Proben

6. Mit einer frischen Wechselspitze wird die LyseLösung durch fünfmalige Aufnahme und Abgabe des vollen Wechselspitzenvolumens gemischt, anschliessend werden je 140 μ l zu den Proben gegeben. Durch die Kombination von Geometrie der THERMOSPRINT-Platte und Abgabegeschwindigkeit des Roboters

- 44 -

wird eine vollständige Mischung von Probe und Lyselösung erreicht. Die Wechsellspitze kommt nicht in Kontakt mit der Probe und muss daher nicht gewechselt werden.

7. Lyse der Proben durch Inkubation für 5min bei Raumtemperatur.

Waschen der Magnetpartikel-DNA-Komplexe

8. Überführung der Arbeitsplatte von Position 5 auf den Magnetseparator (Position 6).
9. 1 min Inkubation zur Abtrennung des Magnetpartikel-DNA-Komplexes.
10. Absaugen der Lyselösung. Der Roboter verwendet für jede Probe eine frische Wechsellspitze, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Bei der Verarbeitung identischer Parallelproben (Probenvolumen grösser 25µl Vollblut bzw. 100µl Vollblut mit vorgeschalteter Erythrozytenlyse) kann der Spitzenwechsel entfallen. Das Absaugen erfolgt durch Aufsaugen von 160µl, 5s Wartezeit und anschliessendes Aufsaugen des restlichen Volumens aus der Spitze der THERMOSPRINT-Gefässe.
11. Überführung der Arbeitsplatte von Position 6 auf Position 5.
12. Zugabe von je 160µl Waschpuffer. Die Wechsellspitze kommt nicht in Kontakt mit der Probe und muss daher nicht gewechselt werden.
13. 1 min Inkubation.
14. Überführung der Arbeitsplatte von Position 5 auf den Magnetseparator (Position 6).
15. 1 min Inkubation zur Abtrennung des Magnetpartikel-DNA-Komplexes.
16. Absaugen der Waschlösung. Der Roboter verwendet für jede Probe eine frische Wechsellspitze, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Bei der Verarbeitung identischer Parallelproben (s. o.) kann der Spitzenwechsel entfallen. Das Absaugen erfolgt durch Aufsaugen von 160 µl, 5s Wartezeit und anschliessendes Aufsaugen des restlichen Volumens aus der Spitze der THERMOSPRINT-Gefässe.

- 45 -

17. Überführung der Arbeitsplatte von Position 6 auf Position 5.
18. Zugabe von je 160 μ l Waschpuffer. Die Wechselspitze kommt nicht in Kontakt mit der Probe und muss daher nicht gewechselt werden.
19. 1 min Inkubation
- 5 20. Überführung der Arbeitsplatte von Position 5 auf den Magnetseparator (Position 6).
21. 1 min Inkubation zur Abtrennung des Magnetpartikel-DNA-Komplexes.
22. Absaugen der Waschlösung. Der Roboter verwendet für jede Probe eine frische Wechselspitze, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Bei der Verarbeitung identischer Parallelproben (s. o.) kann der Spitzenwechsel entfallen. Das Absaugen erfolgt durch Aufsaugen von 160 μ l, 5s Wartezeit und anschliessendes Aufsaugen des restlichen Volumens aus der Spitze der THERMOSPRINT-Gefässe.
- 10 23. 5 min Inkubation bei Raumtemperatur zur Trocknung der Proben (Entfernen des Restethanols aus dem Waschpuffer).
- 15

Resuspendierung der Magnetpartikel

24. Überführung der Arbeitsplatte von Position 6 auf Position 5.
- 20 25. Zugabe von je 100 μ l Elutionspuffer oder Wasser. Die Wechselspitze kommt nicht in Kontakt mit der Probe und muss daher nicht gewechselt werden.
26. Inkubation 3 min zur Anlösung der Magnetpartikel-DNA-Komplexe.
27. Resuspendierung der Magnetpartikel durch fünfmalige Aufnahme und Abgabe des gesamten Probenvolumens. Es wird für jede Probe eine frische Wechselspitze verwendet!
- 25

Die Magnetpartikelsuspension aus Schritt 26 kann direkt als PCR-Template eingesetzt werden (s. HLA-PCR; manuelle Verteilung oder automatisierter Ansatz der PRC-Reaktionen durch den AUTOSPRINT-Roboter).

30

- 46 -

16) Isolierung von Nukleinsäuren aus Fleisch/Wurst mittels Magnetpartikel, beschichtet mit Carboxylgruppen, als Adsorber.

Zur DNA-Isolierung werden stecknadelkopfgrosse Fleisch- oder Wurstproben
5 in 145 μ l BILATEST-Lysepuffer X (Gu-SCN) bestehend aus 3 M Guanidiniumthiocynat [G9277, Fa. Sigma, München], 3% Natriumlauroylsulfat [Fa. Sigma, München], 100 mM Tris/HCl pH7,0 [s. o.] und 1 mM EDTA [E5134, Fa. Sigma, München], und 5 μ l Proteinase K-Lösung ([1373196, Fa. Roche, Mannheim; 20mg ml⁻¹ in 10mM Tris-HCl
10 pH7[s. o.]) mechanisch zerquetscht und 30min bei 65°C in Eppendorfreaktionsgefässen geschüttelt.

Nach der Inkubation werden die Proben abzentrifugiert und der Überstand mit 150 μ l Ethanol [9065, Fa. Roth, Karlsruhe] und 250 μ g Partikeln aus
15 Polyvinylalkohol, hergestellt nach EP 0 843 591, in 5 μ l bidest. Wasser gemischt. Zur DNA-Bindung werden die Proben 5min bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend werden die Partikel mit einem Dauermagnet auf den Boden
20 gezogen und der Überstand abgenommen. Die Partikel werden mit 150 μ l Waschpuffer (10mM Tris-HCl pH7,5 [s. o.], 1mM EDTA [s. o.], 80% Ethanol [s. o.]) gewaschen, wobei der DNA-Magnetpartikelkomplex nicht resuspendiert wird.. Dieser Vorgang wird mindestens einmal wiederholt; danach wird der Komplex 5 min luftgetrocknet, um Ethanolreste zu
25 entfernen.

Die Magnetpartikel werden in 100 μ l Wasser resuspendiert. 2 μ l dieser Proben werden direkt oder nach Elution der DNA und Abtrennung der Partikel in einer PCR-Reaktion mit MT2 und MT11-Primern eingesetzt
30 (Gesamtvolumen des PCR-Ansatzes 50 μ l). Die Analyse in einem Standardagaroseflachbettgel (1,6 % Agarose [Fa. Sigma, München] ergibt ein Bild wie Fig. 26.

- 47 -

Spur Inhalt

- M Marker (λ -HindIII): 23,1|9,4|6,6|4,4|2,3|2,0| 0,56 KB
- 1 PCR-Produkt mit aus Salami isolierter DNA, Beads direkt eingesetzt
- 2 PCR-Produkt mit aus Salami isolierter DNA, DNA eluiert
- 5 3 PCR-Produkt mit aus Putenfleisch isolierter DNA, Beads direkt eingesetzt
- 4 PCR-Produkt mit aus Putenfleisch isolierter DNA, DNA eluiert

17) Isolierung von Nukleinsäuren aus Pflanzen mittels
10 Magnetpartikel, beschichtet mit Carboxylgruppen, als Adsorber.

Das Pflanzenmaterial (Weizen-Blattstückchen) wird in 100 – 300 μ l Extraktionspuffer mechanisch zerkleinert und der entstehende Extrakt durch Zentrifugation geklärt. 75 μ l des klaren Überstandes werden mit einem
15 Gemisch aus 100 μ g Magnetpartikeln aus Polyvinylalkohol, hergestellt nach EP O 843 591 in 75 μ l Ethanol (9065, Fa. Roth, Karlsruhe) versetzt und gemischt. Das Gemisch wird zur DNA-Bindung 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

20 Anschließend werden die Partikel mit einem Dauermagnet auf den Boden gezogen und der Überstand abgenommen. Die Partikel werden mit 150 μ l Waschpuffer (10mM Tris-HCl pH7,5 [s. o.], 1mM EDTA [s. o.], 80% Ethanol [s. o.]) gewaschen, wobei der DNA-Magnetpartikelkomplex nicht resuspendiert wird.. Dieser Vorgang wird mindestens zweimal wiederholt;
25 danach wird der Komplex 5min luftgetrocknet, um Ethanolreste zu entfernen.

Die Magnetpartikel werden anschliessend in 100 μ l BILATEST-Elutionspuffer (10 mM Tris/HCl pH 7,0 [s.o.], 1 mM EDTA[s.o.]) oder Wasser
30 resuspendiert und direkt in der PCR verwendet. Die Analyse der isolierten DNA in einem Standardagaroseflachbettgel (0,8 % Agarose [Fa. Sigma, München] ergibt ein Bild wie Fig. 27.

- 48 -

Spur InhaltM Marker (λ -HindIII): 23,1|9,4|6,6|4,4|2,3|2,0| 0,56 KB

1 Eluat aus Beispiel X unverdünnt

Ansprüche

1. Labor-Roboter (10) mit wenigstens einem in einem vorbestimmten
Arbeitsbereich (14) bewegbaren Roboterarm (18, 20), an welchem
eine Greifvorrichtung (26) zum Ergreifen mindestens einer durch den
Roboterarm (18, 20) zu bewegendes Funktionseinheit (60, 70, 80,
90) angeordnet ist,
dadurch gekennzeichnet, dass an dem Roboterarm (18, 20) bzw. der
Greifvorrichtung (26) ferner eine Orientiervorrichtung (48) vorgesehen
ist, welche mit einer an der Funktionseinheit (60, 70, 80, 90)
gewünschtenfalls vorgesehenen Gegenorientiervorrichtung (54)
zusammenwirkt, um der Funktionseinheit (60, 70, 80, 90) und dem
Roboterarm (18, 20) bzw. der Greifvorrichtung (26) eine vorbe-
stimmte feste Relativorientierung zu verleihen.
2. Labor-Roboter nach dem Oberbegriff des Anspruchs 1 und
gewünschtenfalls dem Kennzeichen des Anspruchs 1,
dadurch gekennzeichnet, dass an dem Roboterarm (18, 20) bzw. der
Greifvorrichtung (26) ferner eine Orientiervorrichtung (48) vorgesehen
ist und dass wenigstens zwei Funktionseinheiten (60, 70, 80, 90)
vorgesehen sind, wobei wenigstens eine der Funktionseinheiten (60,
70, 80, 90) eine Gegenorientiervorrichtung (54) aufweist, welche der
am Roboterarm (18, 20) vorgesehenen Orientiervorrichtung (48)
zusammenwirkt, um der Funktionseinheit (60, 70, 80, 90) und dem
Roboterarm (18, 20) bzw. der Greifvorrichtung (26) eine vorbe-
stimmte feste Relativorientierung zu verleihen.
3. Labor-Roboter nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet, dass eine der Vorrichtungen, nämlich die
Orientiervorrichtung oder die Gegenorientiervorrichtung, einen
Orientierungsdorn (54) umfasst und dass die jeweils andere Vor-

- 50 -

richtung, nämlich die Gegenorientiervorrichtung oder die Orientiervorrichtung, eine Aufnahme (48) für den Orientierungsdorn (54) umfasst.

- 5 4. Labor-Roboter nach Anspruch 3,
dadurch gekennzeichnet, dass an dem Orientierdorn (54) oder/und
der Aufnahme (48) wenigstens eine Einweisungsschräge (54a, 48a)
vorgesehen ist.
- 10 5. Labor-Roboter nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet, dass die Greifvorrichtung (26) nach Art
einer Verdeckelungs-Greifvorrichtung ausgebildet ist.
- 15 6. Labor-Roboter nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
dadurch gekennzeichnet, dass die Greifvorrichtung (26) länglich
ausgebildet ist und wenigstens ein Greifwerkzeug (40) sowie eine
Betätigungsvorrichtung (44) zur Betätigung des Greifwerkzeugs (40)
umfasst, wobei das Greifwerkzeug (40) im Wesentlichen innerhalb
einer Projektion (P) der Betätigungsvorrichtung (44) in Richtung der
20 Längsachse (A) der Greifervorrichtung (26) angeordnet ist.
- 25 7. Labor-Roboter nach Anspruch 6,
dadurch gekennzeichnet, dass die Betätigungsvorrichtung (44)
elektrisch, beispielsweise elektromagnetisch, oder/und hydraulisch
oder/und pneumatisch betätigbar ist.
- 30 8. Labor-Roboter nach Anspruch 6,
dadurch gekennzeichnet, dass die Betätigung der Greifvorrichtung
(26) von einer Bewegung des Roboterarms (18, 20) abgeleitet wird.

- 51 -

9. Labor-Roboter nach einem der Ansprüche 1 bis 8,
dadurch gekennzeichnet, dass an der Funktionseinheit (60, 70, 80, 90) eine Angriffsstelle für die Greifvorrichtung (26) vorgesehen ist, beispielsweise ein Angriffszapfen (52a) oder eine Angriffsvertiefung.

5

10. Labor-Roboter nach einem der Ansprüche 1 bis 9,
dadurch gekennzeichnet, dass der Roboterarm (18, 20) in einem vorbestimmten Arbeitsbereich (14) des Labor-Roboters (10) im Wesentlichen frei im Raum bewegbar ist.

10

11. Labor-Roboter nach einem der Ansprüche 1 bis 10,
dadurch gekennzeichnet, dass im Arbeitsbereich (14) des Labor-Roboters (10) eine Mehrzahl von Parkpositionen (28) für Funktionseinheiten (60, 70, 80, 90) vorgesehen ist.

15

12. Labor-Roboter nach einem der Ansprüche 1 bis 11,
dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens eine Funktionseinheit (60) einen Gabelrahmen umfasst, der vorzugsweise zum Transport wenigstens einer Mikrotitrationsplatte (30) ausgebildet ist.

20

13. Labor-Roboter nach einem der Ansprüche 1 bis 12,
dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens eine Funktionseinheit (70) zumindest einen Teil einer Pipettiervorrichtung umfasst.

25

14. Labor-Roboter nach einem der Ansprüche 1 bis 13,
dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens eine Funktionseinheit (80) eine Magnetvorrichtung umfasst.

30

15. Labor-Roboter nach Anspruch 14,
dadurch gekennzeichnet, dass die Magnetvorrichtung (80) wenigstens einen Permanentmagneten (82) umfasst.

- 52 -

16. Labor-Roboter nach einem der Ansprüche 1 bis 15,
dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens eine Funktionseinheit (90)
eine Barcode-Lesevorrichtung umfasst.

17. Labor-Roboter nach einem der Ansprüche 1 bis 16,
dadurch gekennzeichnet, dass eine Steuereinheit (22) vorgesehen ist
zur Steuerung bzw. Regelung der Bewegung des Roboterarms (18,
20) oder/und der Betätigung der Greifvorrichtung (26) oder/und des
Betriebs der Barcode-Lesevorrichtung (90) oder/und des Betriebs der
Magnetvorrichtung (80) oder/und des Betriebs der Pipettiereinheit
(70).

18. Labor-Roboter nach einem der Ansprüche 1 bis 17,
dadurch gekennzeichnet, dass im Arbeitsbereich (14) des Labor-
Roboters (10) wenigstens eine Lagervorrichtung (62) für eine
Mikrotitrationsplatte (30) vorgesehen ist.

19. Reagenzenkit für die Isolierung von Nukleinsäuren aus einer
biologische, nukleinsäurehaltige Kompartimente enthaltenden Probe,
dadurch gekennzeichnet, dass er

- a) negativ geladene Partikel aus einem Polymermaterial,
- b) ein Reagenz I bestehend aus einem Gemisch eines geladenen
oder ungeladenen Detergens und einem aliphatischen Alkohol,
oder/und ein Reagenz II, bestehend aus einer wässrigen
Lösung mindestens eines chaotropen Salzes und gegebenen-
falls einem aliphatischen Alkohol, und
- c) eine Proteinase-Lösung
enthält.

RI:
kein Salz!

RII:
kein
kat. Detergens

20. Reagenzienkit nach Anspruch 19,
dadurch gekennzeichnet, daß er negativ geladene Partikel aus
Polystyrol oder insbesondere aus Polyvinylalkohol enthält.

- 53 -

21. Reagenzienkit nach Anspruch 19 oder 20,
dadurch gekennzeichnet, daß die Partikel magnetisch beeinflußbar
sind.
- 5 22. Reagenzienkit nach einem der Ansprüche 19 bis 21,
dadurch gekennzeichnet, daß die Partikel einen durchschnittlichen
Durchmesser von 0,1 bis 100 μm und insbesondere von 1 bis 10 μm
aufweisen.
- 10 23. Reagenzienkit nach einem der Ansprüche 19 bis 22,
dadurch gekennzeichnet, daß die Partikel Carboxylgruppen an der
Oberfläche aufweisen.
- 15 24. Reagenzienkit nach einem der Ansprüche 19 bis 23,
dadurch gekennzeichnet, daß das Reagenz I als Detergens
Natriumdodecylsulfat oder DTAB, vorzugsweise in einer Menge von
1 bis 10 % enthält.
- 20 25. Reagenzienkit nach einem der Ansprüche 19 bis 24,
dadurch gekennzeichnet, daß Reagenz I oder/und Reagenz II als
aliphatischen Alkohol Ethanol, vorzugsweise in einer Konzentration
von mindestens 40 Vol. % enthält.
- 25 26. Reagenzienkit nach einem der Ansprüche 19 bis 25,
dadurch gekennzeichnet, daß Reagenz II als chaotrope Salze
Guanidiniumhydrochlorid oder Guanidiniumthiocyanat, vorzugsweise
in Konzentrationen von 2 bis 8 M enthält.
- 30 27. Reagenzienkit nach einem der Ansprüche 19 bis 26,
dadurch gekennzeichnet, daß er eine Proteinase K-Lösung enthält.

- 54 -

28. Reagenzienkit nach einem der Ansprüche 19 bis 27,
dadurch gekennzeichnet, daß die Reagenzien I oder/und II weitere
Puffer- oder/und Komplexbildungssubstanzen enthalten.

29. Reagenzienkit nach einem der Ansprüche 19 bis 28,
dadurch gekennzeichnet, daß die Reagenzien I und II einen pH-Wert
von 6 bis 8 aufweisen.

30. Reagenzienkit nach einem der Ansprüche 19 bis 29,
dadurch gekennzeichnet, daß er zusätzlich
d) Waschpuffer oder/und
e) Elutionspuffer zur Ablösung der an die Partikel gebundenen
Nukleinsäuren
enthält.

31. Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren aus einer biologische,
nukleinsäurehaltige Kompartimente enthaltenden Probe,
dadurch gekennzeichnet, daß man die Probe gleichzeitig mit negativ
geladenen Partikeln aus einem Polymermaterial und einem Reagenz,
bestehend aus einem Gemisch eines geladenen oder ungeladenen
Detergens und einem aliphatischen Alkohol, oder bestehend aus einer
wässrigen Lösung mindestens eines chaotropen Salzes und
gegebenenfalls einem aliphatischen Alkohol versetzt, danach die
Partikel in geeigneter Weise von der überstehenden Lösung abtrennt,
ggf. wäscht und entweder die an die Partikel gebundenen
Nukleinsäuren direkt für weitere Verfahren verwendet oder die an die
Partikel gebundenen Nukleinsäuren mittels eines Elutionspuffers von
den Partikeln löst.

32. Verfahren nach Anspruch 31,
dadurch gekennzeichnet, daß man zusätzlich zu dem Reagenz eine
Proteinase, vorzugsweise Proteinase-K, zusetzt.

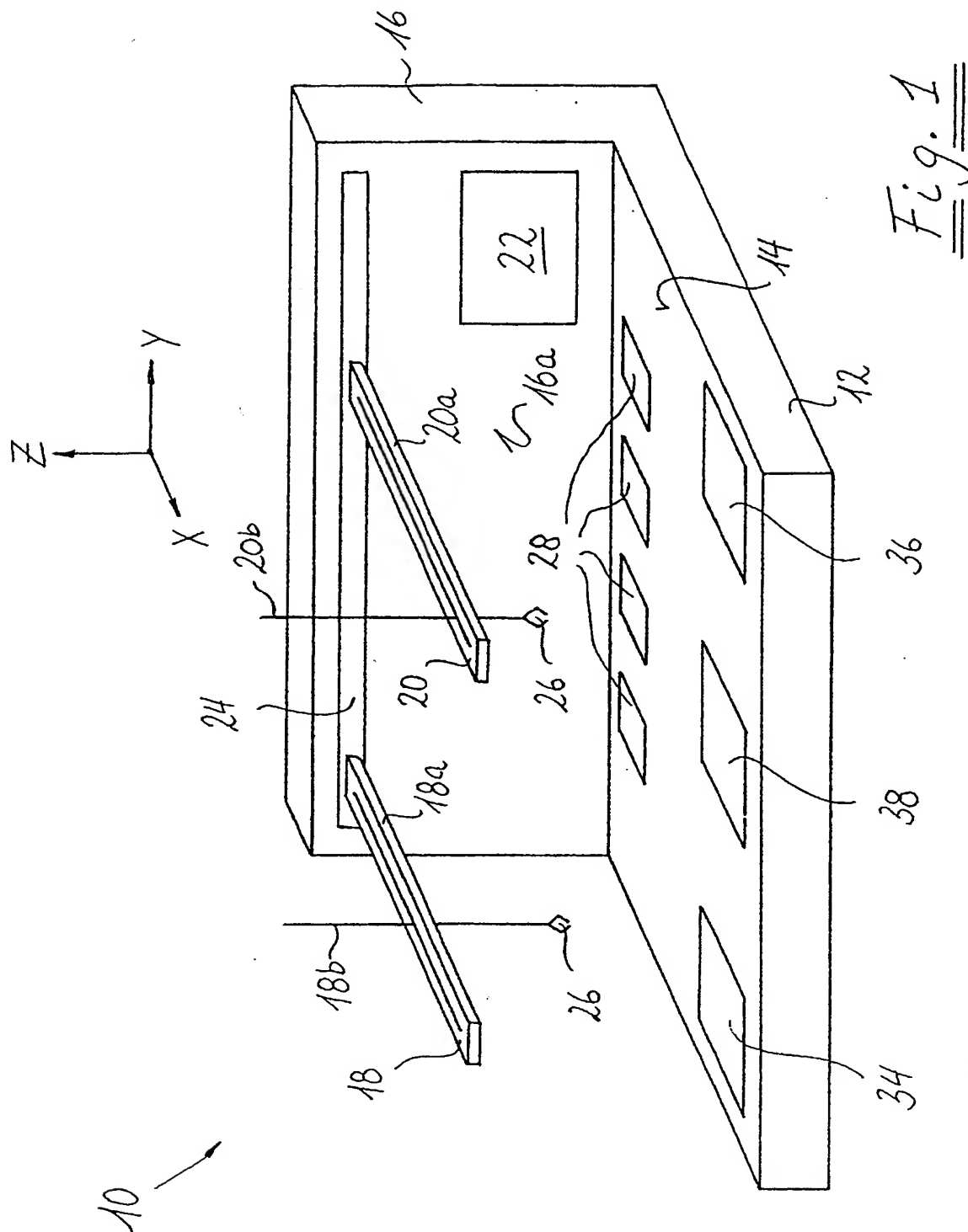
- 55 -

33. Verfahren nach Anspruch 31 oder 32,
dadurch gekennzeichnet, daß man als Partikel aus Polymermaterial
Polystyrol oder insbesondere Polyvinylalkoholpartikel einsetzt.
- 5 34. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 33,
dadurch gekennzeichnet, daß man magnetisch beeinflussbare Partikel
verwendet und diese mit Hilfe eines Magneten von der
überstehenden Lösung separiert.
- 10 35. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 34,
dadurch gekennzeichnet, daß man Partikel mit einem
durchschnittlichen Durchmesser von 0,1 bis 100 μm und
insbesondere von 1 bis 10 μm verwendet.
- 15 36. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 35,
dadurch gekennzeichnet, daß man Partikel mit Carboxylgruppen an
der Oberfläche verwendet.
- 20 37. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 36,
dadurch gekennzeichnet, daß man zur Isolierung von Nukleinsäuren
aus Proben enthaltend Hefezellen ein Reagenz enthaltend
Natriumdodecylsulfat oder DTAB, vorzugsweise in Mengen von 1 bis
10 % verwendet.
- 25 38. Verfahren nach Anspruch 37,
dadurch gekennzeichnet, daß das Reagenz als aliphatischen Alkohol
Ethanol, vorzugsweise in einer Konzentration von mindestens 40
Vol.% verwendet.
- 30 39. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 36,
dadurch gekennzeichnet, daß man zur Isolierung von Nukleinsäuren
insbesondere aus Vollblut ein Reagenz enthaltend

- 56 -

Guanidiniumhydrochlorid oder Guanidiniumthiocyanat, vorzugsweise jeweils in Konzentrationen von 2 bis 8 M, verwendet.

40. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 39,
dadurch gekennzeichnet, daß man den Reagenzien weitere
Puffersubstanzen und/oder Komplexbildner zusetzt.
41. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 40,
dadurch gekennzeichnet, daß man die separierten mit Nukleinsäuren
beladenen Partikel mit einem Waschpuffer enthaltend mindestens 60
% Ethanol wäscht.
42. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 41,
dadurch gekennzeichnet, daß man es unter Verwendung eines
Reagenzienkits nach einem der Ansprüche 19 bis 30 durchführt.
43. Verfahren zur Amplifikation oder/und Bestimmung von Nukleinsäuren
mittels einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR),
dadurch gekennzeichnet, daß man die zu amplifizierenden
Nukleinsäuren aus einer biologische, nukleinsäurehaltige
Kompartimente enthaltenden Probe mit Hilfe eines Verfahrens nach
einem der Ansprüche 31 bis 42 gewinnt und die
Amplifikationsreaktion sowie ggf. die Bestimmung nach an sich
bekannten Methoden bewirkt.
44. Verwendung eines Labor-Roboters nach einem der Ansprüche 1 bis
12 zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 31
bis 43.



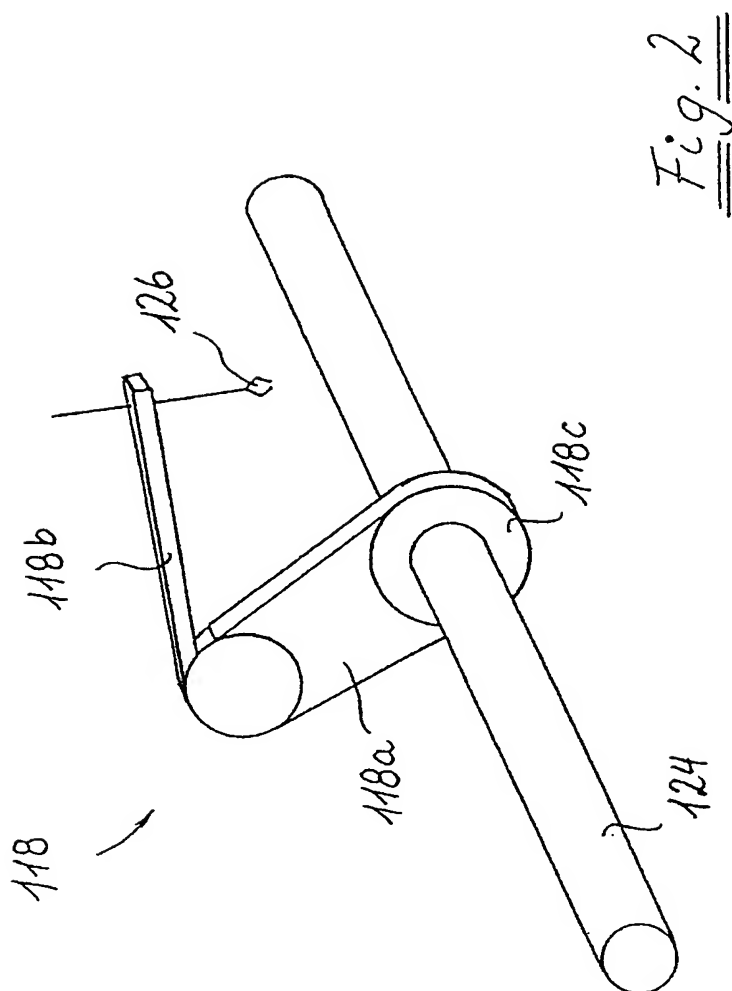


Fig. 2

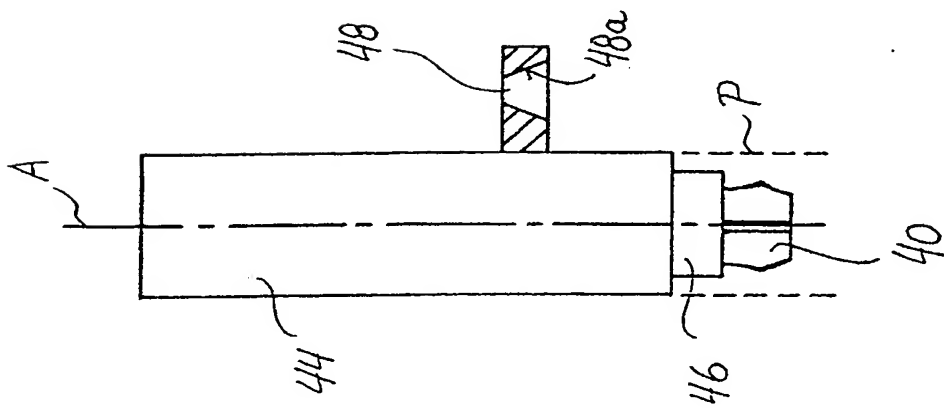


Fig. 3

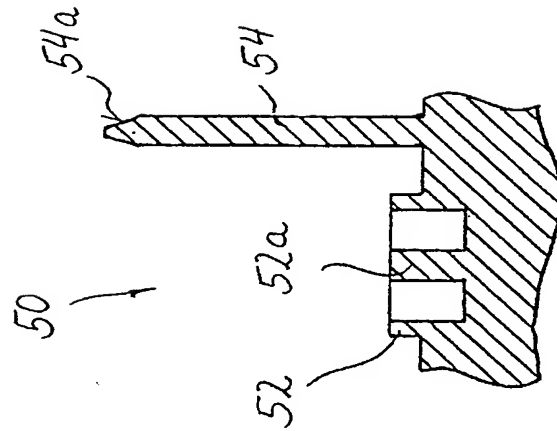
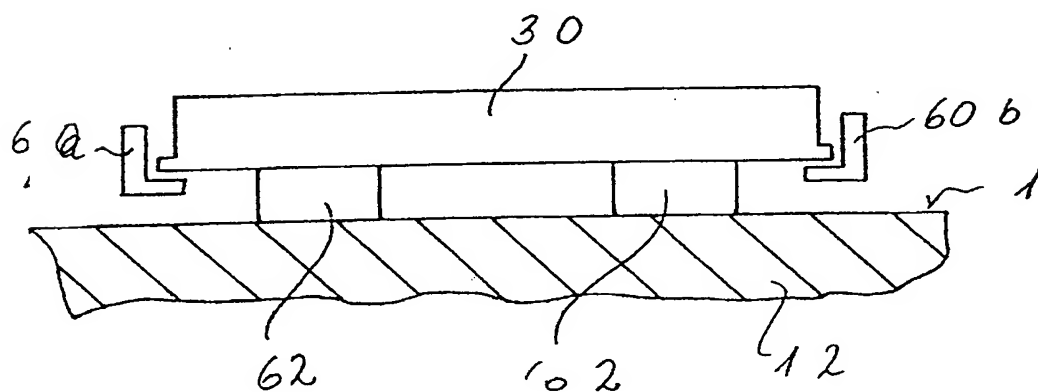
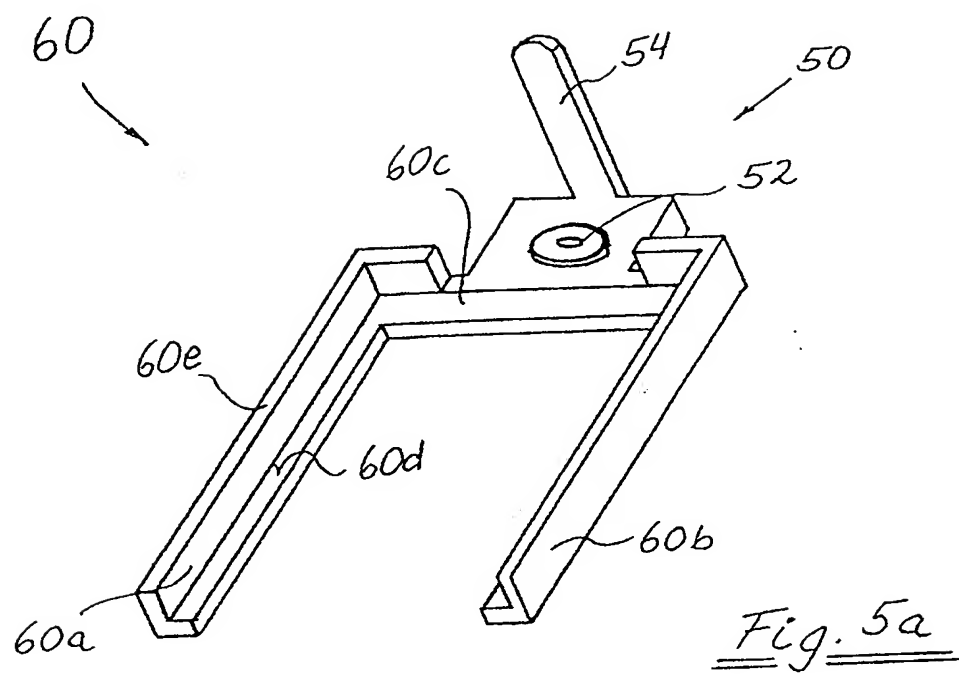


Fig. 4



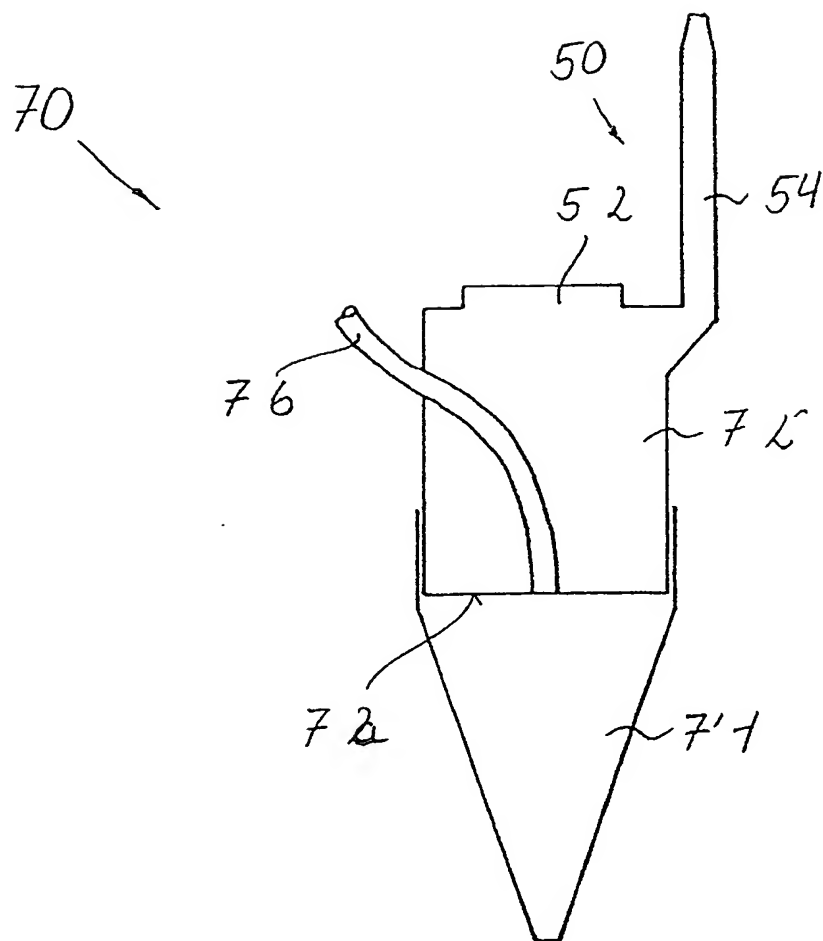


Fig. 6

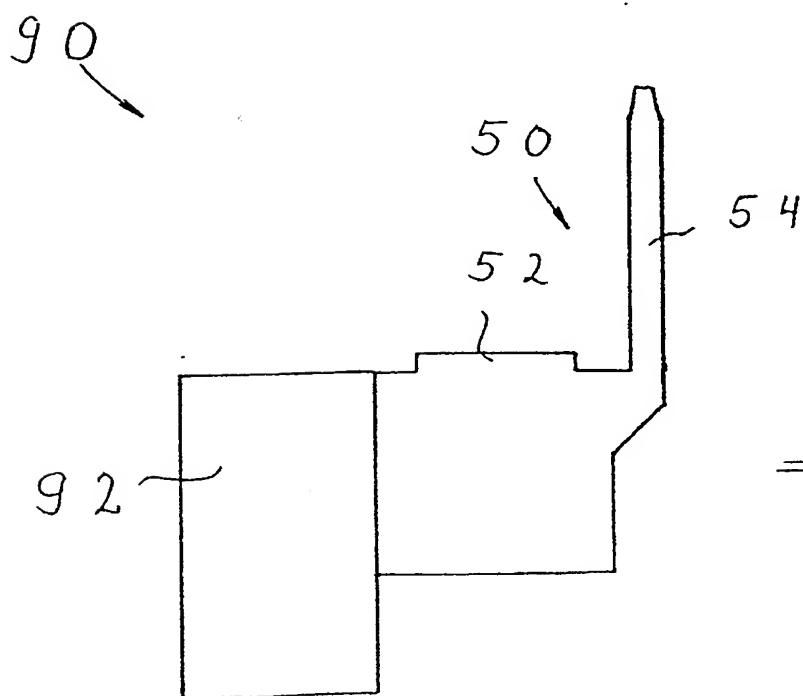
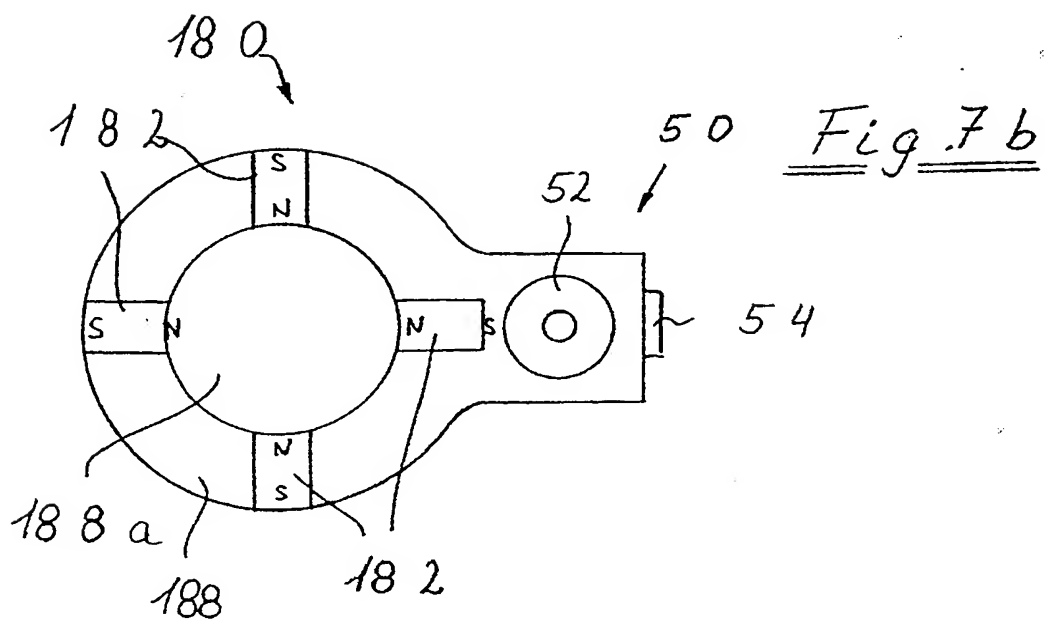
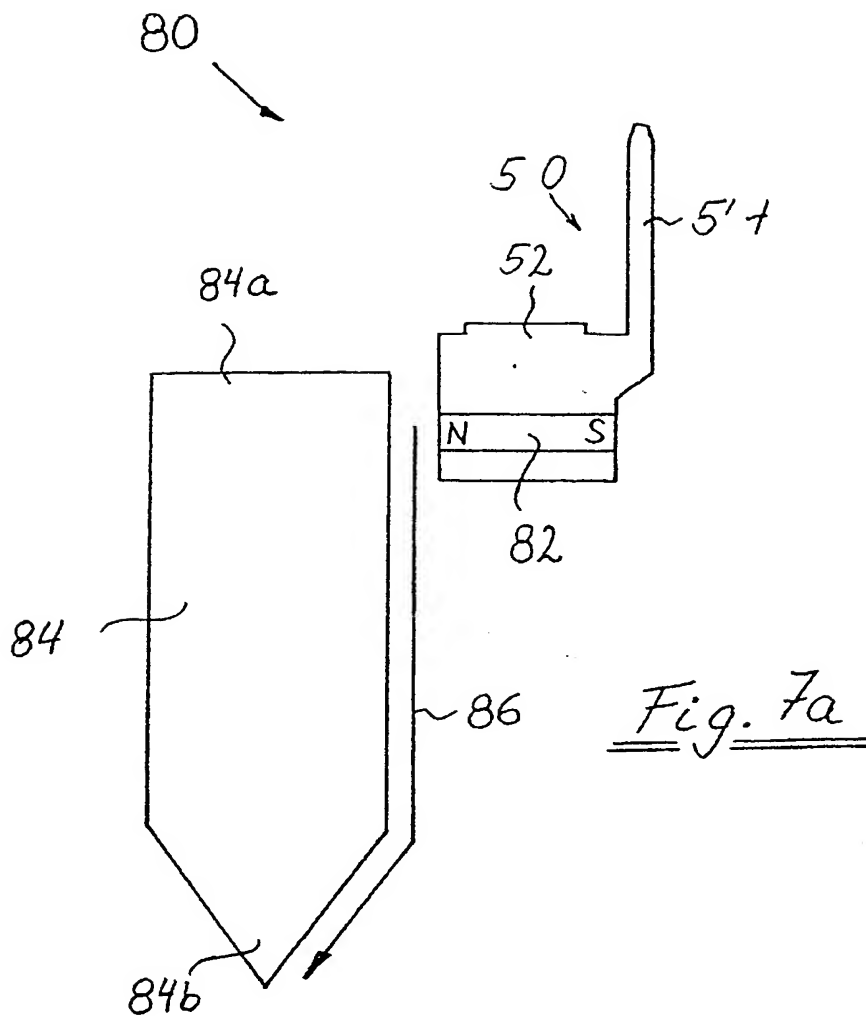


Fig. 8



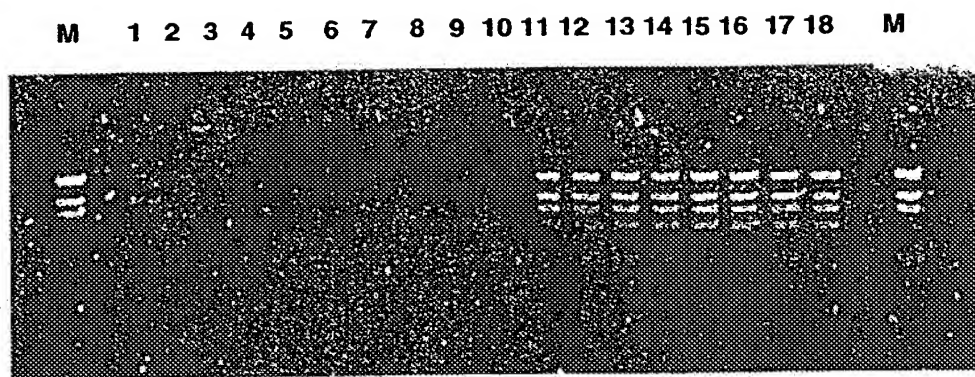


Fig. 9

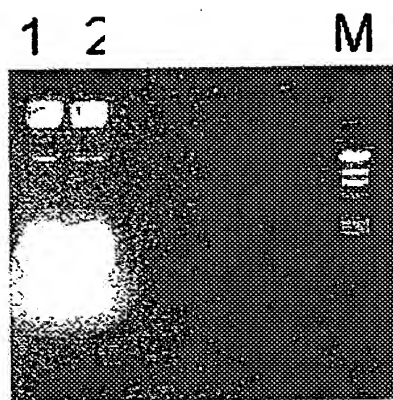


Fig. 10



Fig. 11

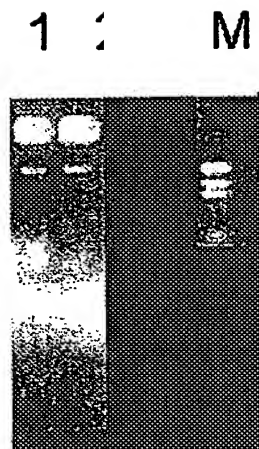


Fig. 12

M 1 2 3

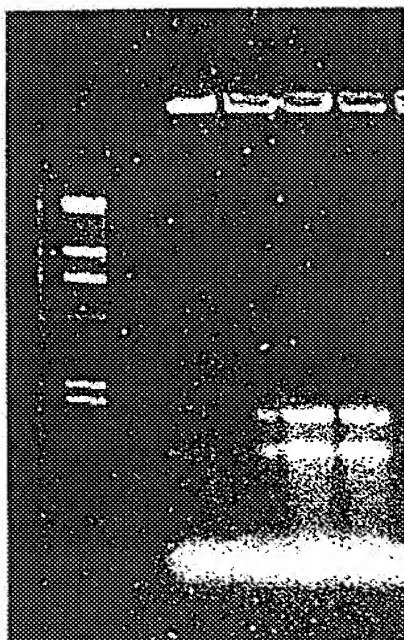


Fig. 13

M 1 2 3 4 5 6

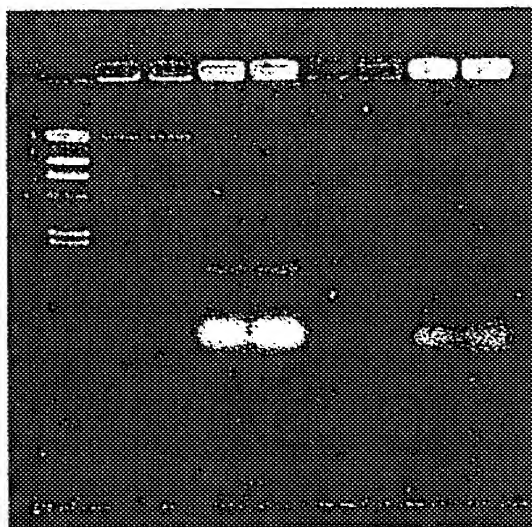


Fig. 14

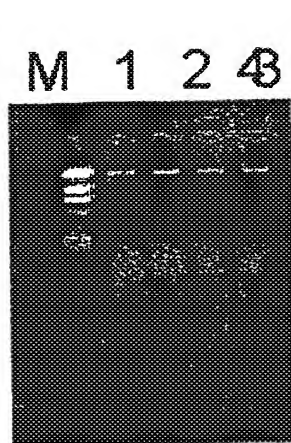


Fig. 15

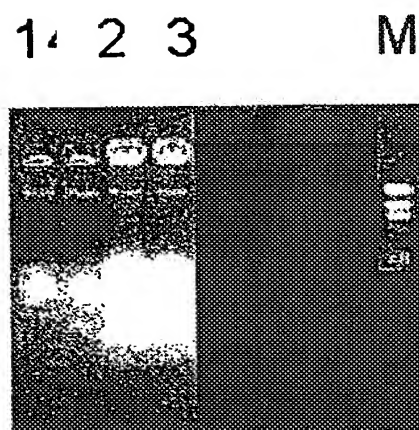


Fig. 16

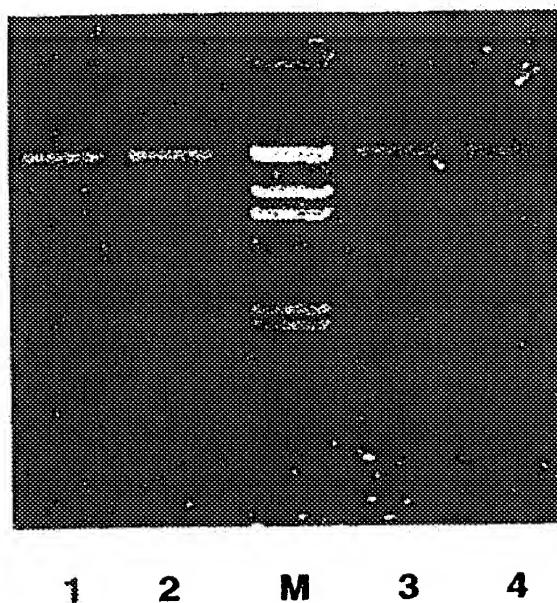


Fig. 17



Fig. 18

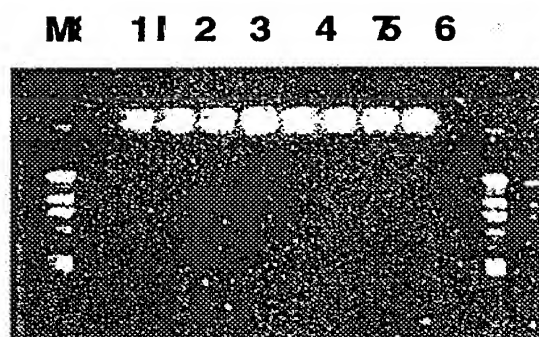


Fig. 19

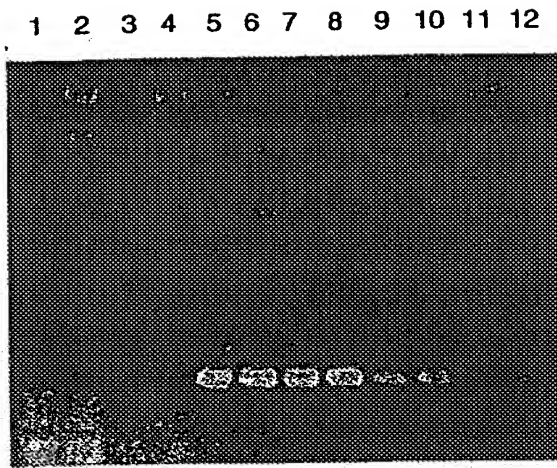


Fig. 20

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 M

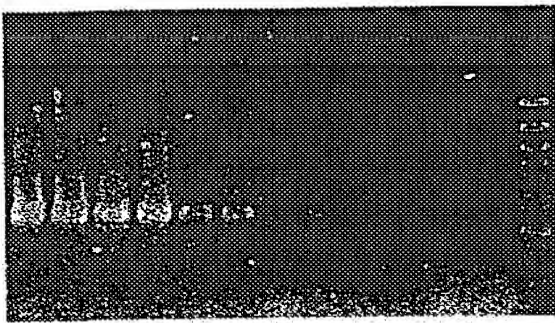


Fig. 21

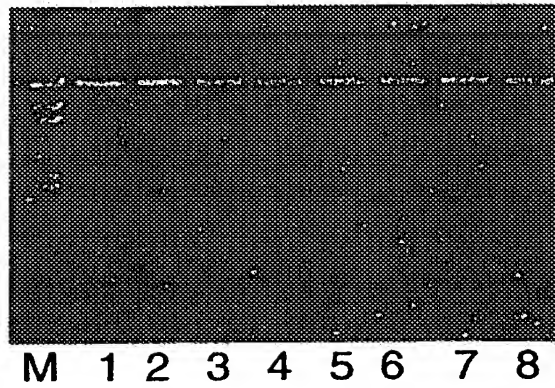
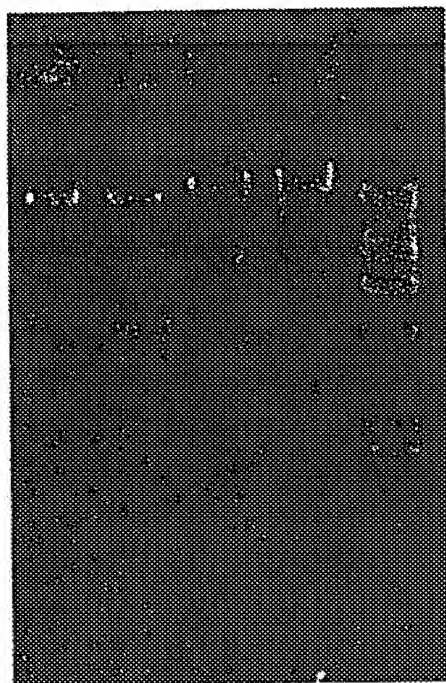


Fig. 22: Isolierung von genomischer DNA aus humanem EDTA Vollblut (Probenvolumen 10 μ l)



1 2 3 4

Fig. 23: Aus humanem EDTA-Vollblut eluierte DNA, Probenvolumen 10µl und 25µl EDTA-Vollblut sowie 50µl und 100µl EDTA-Vollblut mit vorgeschalteter Erythrozytenlyse, Beads ohne Elution auf Agarosegel aufgetragen

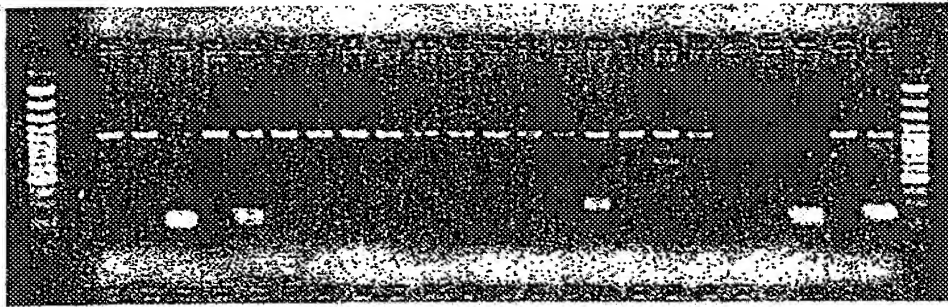


Fig. 24: HLA-DRB-PCR, Beads ohne Elution eingesetzt
(Probenvolumen 50µl mit vorgeschalteter Erythrozytenlyse (s. Fig. 2), Magnetpartikelmenge auf 100µg reduziert; erste und letzte Spur Marker, zweite Spur Kontrolle, danach 23 verschiedene PCR-Reaktionen mit hochmolekularem Kontrollprodukt von etwa 1000bp sowie spezifischen niedermolekularen Produkten in 5 Spuren)

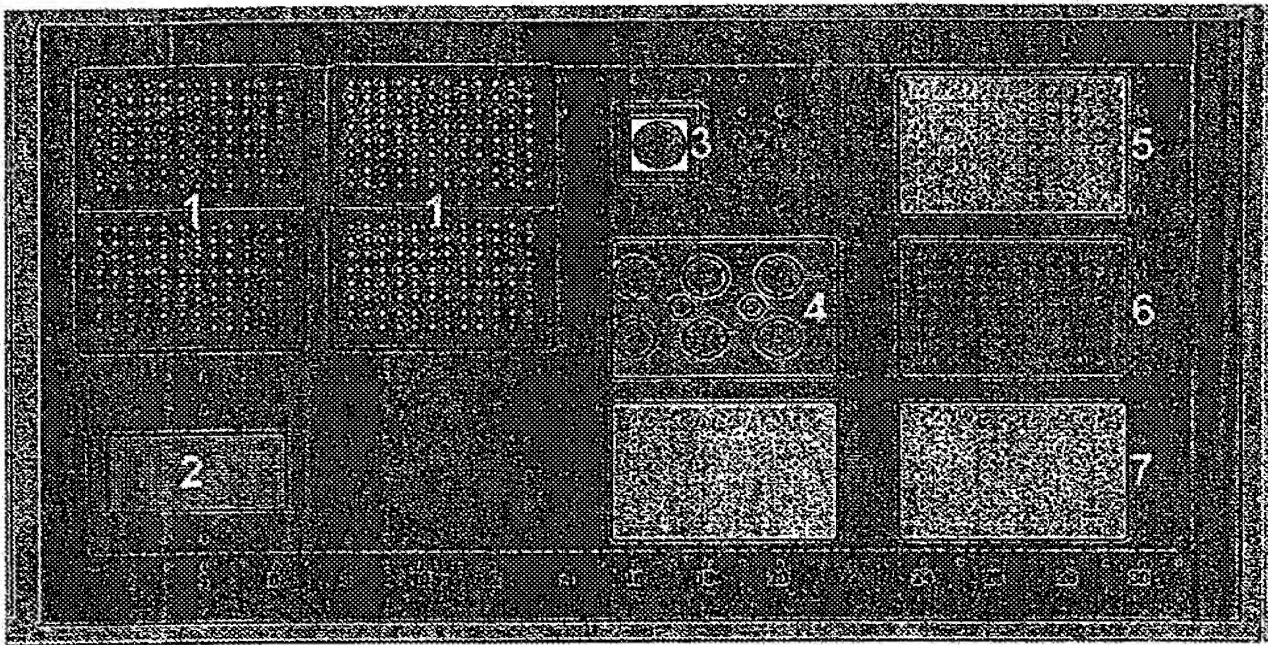
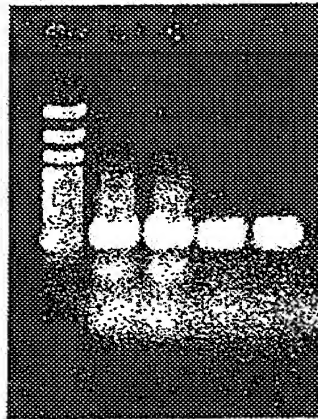


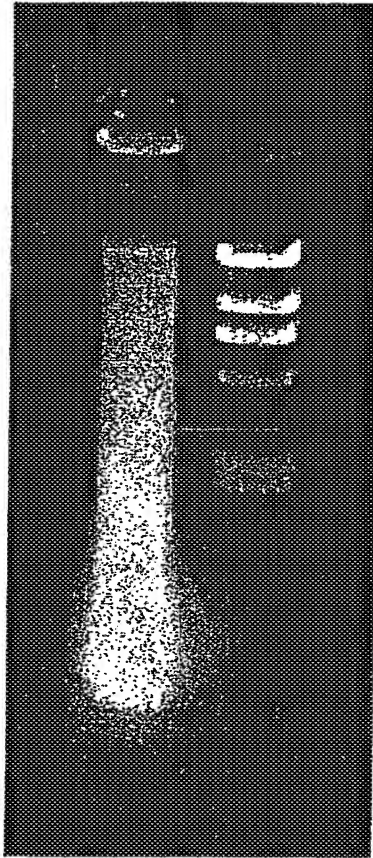
Fig. 25: Layout der Arbeitsplattform des Pipettierroboters AUTOSPRINT

- 1 Racks mit Wechselspitzen
- 2 Wechselspitzenabwurf
- 3 Flüssigkeitsabfall
- 4 Block für BILATEST-Reagenziensatz
- 5 Arbeitsposition 1
- 6 Magnetseparator M96
- 7 Arbeitsposition 2



M 1 2 3 4

Fig. 26: PCR-Produkte mit aus Wurst und Fleisch isolierter DNA (Salami und Putenfleisch, Beads direkt oder DNA nach Elution in der PCR eingesetzt).



1 M

Fig. 27: Aus Weizenblättern isolierte DNA

1 7 /

